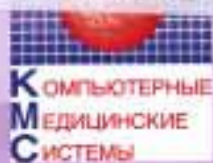


004
K63



Федеральное агентство по образованию РФ
Федеральный исследовательский ядерный университет «МИФИ»
Экспертно-криминалистический центр МВД России

И. В. СТОРОЖЕНКО, А. Ю. КУЛЬТИН, В. Г. НИКИТАЕВ,
А. Н. ПРОНИЧЕВ, Е. Ю. БЕРДНИКОВИЧ

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СУДЕБНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ



Москва 2010

OL
Федеральное агентство по образованию Российской Федерации К
Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»
Экспертно-криминалистический центр МВД России

И. В. СТОРОЖЕНКО, А. Ю. КУЛЬТИН, В. Г. НИКИТАЕВ,
А. Н. ПРОНИЧЕВ, Е. Ю. БЕРДНИКОВИЧ

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СУДЕБНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ

Учебное пособие

Москва 2010

УДК 004(075)+340.6(075)

ББК 32.81я+58я7

К63

791005

Компьютерные технологии в судебно-генетической экспертизе:
учебное пособие. / И.В. Стороженко, А.Ю. Культин, В.Г. Никитаев, А.Н.
Проничев, Е.Ю. Бердникович. М.: НИЯУ МИФИ, 2010. – 112 с.

Идентификация личности методами ДНК-анализа является в настоящее время одним из наиболее перспективных направлений использования научно-технических достижений в правоохранительной деятельности. В органах внутренних дел России создана мощная лабораторная база для проведения исследований ДНК и ведения учетов данных анализа ДНК. Благодаря применению современных автоматизированных систем выявляются новые качественные возможности ДНК-анализа, совершенствуются методики исследования ДНК, что, в свою очередь, способствует повышению доказательной значимости результатов экспертных исследований ДНК биологических следов при раскрытии и расследовании преступлений.

Учебное пособие предназначено для обучения студентов кафедры «Компьютерные медицинские системы» МИФИ. Оно может быть использовано также в процессе обучения студентов медико-технических и медицинских специальностей вузов.

Рецензенты: д-р техн. наук, проф. *В.А. Власов*,
канд. биол. наук *А.В. Саламатин*

ISBN 978-5-7262-1274-6

© Национальный исследовательский
ядерный университет «МИФИ», 2010

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	4
1. Судебно-генетическая экспертиза	
1.1. Основные понятия и классификация судебных экспертиз	7
1.2. Методологические основы и возможности судебно-генетической экспертизы	11
Контрольные вопросы	17
2. Основные приемы и методы изъятия объектов биологического происхождения	
2.1. Поиск объектов биологического происхождения при осмотре места происшествия	18
2.2. Предварительные исследования объектов биологического происхождения	23
2.3. Фиксация следов описанием в протоколе осмотра .	26
Контрольные вопросы	28
3. Молекулярно-биологические основы криминалистического ДНК-анализа	
3.1. Строение и свойства молекулы ДНК	29
3.2. Деление и полиморфизм молекулы ДНК	33
3.3. Основные методы исследования ДНК	37
Контрольные вопросы	39
4. Методы исследования ядерной ДНК	
4.1. Технологическая схема исследования ядерной ДНК	40
4.2. Полимеразная цепная реакция	44
4.3. Полимеразная цепная реакция в реальном времени	50
4.4. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР	57
Контрольные вопросы	67
5. Обработка и оценка результатов исследования ДНК и заключение эксперта	
5.1. Вероятностно-статистическая оценка идентификационной значимости результатов исследования ...	70
5.2. Выводы по результатам экспертизы	77
5.3. Заключение эксперта	79
Контрольные вопросы	84
6. Возможности исследования митохондриальной ДНК биологических следов человека	
6.1. Метод секвенирования митохондриальной ДНК	86
6.2. Основные этапы исследования мтДНК	88
Контрольные вопросы	94

7. Создание базы данных ДНК

7.1. Цель создания базы данных ДНК	95
7.2. Предпроектное обследование	96
7.3. Логическое проектирование	97
7.4. Физическое проектирование	100
7.5. Физическая реализация	104
7.6. Концепции развития национальных систем генетической регистрации граждан	105
Контрольные вопросы.....	109
Библиографический список	110

ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящее время одним из наиболее перспективных направлений использования научно-технических достижений в правоохранительной деятельности является идентификация личности методами ДНК-анализа. В органах внутренних дел России создана мощная лабораторная база для проведения исследований ДНК и ведения учетов данных анализа ДНК. Получаемые данные анализа ДНК являются совместимыми как между различными лабораториями системы МВД, так и с данными анализа ДНК большинства зарубежных лабораторий.

Веление сегодняшнего времени – применение современных автоматизированных систем анализа ДНК. Благодаря этому выявляются новые качественные возможности ДНК-анализа, совершенствуются методики исследования ДНК, что, в свою очередь, способствует повышению доказательной значимости результатов экспертных исследований ДНК биологических следов при расследовании преступлений. Несомненно, развитие данного направления останется приоритетным на многие десятилетия вперед.

Задачей настоящего пособия является изложение всех этапов производства судебно-генетической экспертизы и возможностей компьютерных технологий, применяемых на этих этапах.

Авторы представляют историю развития, основные понятия и методы судебно-генетической экспертизы. Здесь также рассмотрены строение и свойства ДНК. Представлены основные этапы осмотра места происшествия и предварительного исследования объектов. Приведены правила изъятия следов биологического происхождения.

Приводится общая схема криминалистического исследования ДНК человека, основные методы выделения ДНК из исследуемых биологических объектов.

Дана характеристика основных этапов исследования STR-локусов ДНК и проведена оценка возможностей применения современных автоматизированных систем на различных этапах исследования STR-локусов ДНК.

Авторы отмечают, что именно технология исследования STR-локусов, применяемая в настоящее время, является наиболее распространенной в

практике криминалистического ДНК-анализа. Это связано с ее относительной простотой, а также возможностью автоматизировать многие этапы исследования.

Читатель получит представление о строении митохондриального генома человека, свойствах митохондриальной ДНК и методе ее секвенирования.

В пособии приведен пример заключения эксперта, который может быть использован в качестве основы для изложения результатов исследования ДНК с применением автоматизированного оборудования.

Здесь также рассмотрены принципы организации баз данных в области судебных экспертиз.

Пособие предназначено для обучения студентов кафедры «Компьютерные медицинские системы» МИФИ. Оно может быть использовано также в процессе обучения студентов медико-технических и медицинских специальностей вузов.

1. СУДЕБНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

1.1. Основные понятия и классификации судебных экспертиз

Основные понятия судебной экспертизы. По определению, данному в «Энциклопедическом словаре», *экспертиза* – исследование каких-либо вопросов, требующих специальных познаний в области науки, техники, искусства и т.д., проводимое специалистом (экспертом).

Согласно Федеральному закону «О государственной судебно-экспертной деятельности в Российской Федерации» *судебная экспертиза* – процессуальное действие, состоящее из проведения исследований и дачи заключения экспертом по вопросам, разрешение которых требует специальных знаний в области науки, техники, искусства или ремесла и которые поставлены перед экспертом судом, судьей, органом дознания, лицом, производящим дознание, следователем или прокурором, в целях установления обстоятельств, подлежащих доказыванию по конкретному делу.

Таким образом, термин «судебная» в названии экспертизы определяется ее задачами и конечной целью – применение результатов в процессе судопроизводства и при раскрытии, расследовании преступлений уполномоченными на то государственными органами и лицами.

Судебная экспертиза – это отличная от других специфическая разновидность экспертиз, обладающих особым статусом. Сходство ее с экспертизами в других сферах человеческой деятельности заключается в том, что она по своей сути является исследованием, основанным на использовании специальных знаний.

Среди основных задач, разрешаемых судебными экспертизами, по характеру основных целей экспертного исследования можно выделить *идентификационные задачи*.

Объект экспертного исследования – это материальный объект, содержащий информацию, необходимую для решения экспертной задачи. К объектам в судебной экспертизе относятся вещественные доказательства, документы, предметы, люди, животные, трупы и их

части, образцы для сравнительного исследования, а также материалы дела, по которому производится судебная экспертиза.

Судебный эксперт – это лицо, обладающее специальными знаниями, назначенное судом в порядке, установленном процессуальным законодательством для производства судебной экспертизы и дачи заключения.

Экспертом может быть назначено любое лицо, обладающее необходимыми для дачи заключения знаниями. Судебные экспертизы проводятся экспертами государственных и негосударственных экспертных учреждений, сотрудниками неэкспертных учреждений, частными экспертами, либо иными специалистами.

Классификация судебных экспертиз. С учетом следственно-судебной и экспертной практики при производстве экспертиз принято выделять четыре уровня:

- 1 – классы (типы);
- 2 – роды;
- 3 – виды;
- 4 – разновидности (подвиды).

Класс экспертизы составляют экспертные исследования, объединяемые общностью знаний, служащих источником формирования теоретических и методических основ судебных экспертиз, и объектов, исследуемых на базе этих знаний. Все судебные экспертизы разделяют на 12 классов, например: класс криминалистических экспертиз, класс инженерно-технических экспертиз, класс судебно-медицинских экспертиз и т.д.

Роды экспертиз различаются по предмету и объектам и соответственно методикам экспертного исследования. Например, в криминалистической экспертизе на уровне рода выделяют судебные: почерковедческие, автороведческие, технические экспертизы документов, трасологические, баллистические, портретные и др.

Вид экспертизы составляют элементы рода, отличающиеся специфичностью предмета в отношении общих для рода объектов и методик. Например, в судебно-медицинской экспертизе выделяют судебно-медицинское исследование трупов; освидетельствование живых лиц; исследование вещественных доказательств.

Подвид экспертизы – составные части вида, отличающиеся своеобразной группой задач, характерных для предмета данного

вида экспертизы, и комплексами метода исследования отдельных объектов или их групп. Например, в рамках криминалистической экспертизы реквизитов документов можно выделить экспертизы оттисков печатей (штампов) для их отождествления и решения диагностических задач; документов, полученных с применением копировальной техники; машинописных текстов и т. д.

Помимо данной классификации, существуют и другие деления экспертиз.

По месту проведения экспертизы подразделяются на *проводимые в экспертных учреждениях и вне экспертных учреждений*, поскольку процессуальное законодательство позволяет назначить экспертом любое лицо, обладающее специальными познаниями, необходимыми для разрешения возникших по делу вопросов.

По объему исследования экспертизы делятся на *основные и дополнительные*. Дополнительная экспертиза назначается при неполноте или неясности выводов основной экспертизы. Неясность заключения выражается в том, что по нему нельзя судить о конкретных фактах, установить, является ли вывод положительным или отрицательным, категорическим или вероятным. Если эксперт исследовал не все представленные в его распоряжение объекты, а только часть их или решил только некоторые из поставленных перед ним вопросов, то такая экспертиза является неполной.

Дополнительная экспертиза назначается и в тех случаях, когда после экспертного исследования возникают новые вопросы, связанные с исследованием того же объекта, которые ранее не ставились перед экспертом. Так как дополнительная экспертиза назначается не ради опровержения результатов основной экспертизы, а для разъяснения, уточнения, конкретизации, она в большинстве случаев поручается тому же эксперту, уже знакомому с обстоятельствами дела. Однако может быть назначен и другой эксперт.

По последовательности проведения экспертизы подразделяются на *первичные и повторные*. Повторной называется экспертиза, производимая по тем же объектам и решающая те же вопросы, что и первичная экспертиза, но заключение которой признано необоснованным или вызывает сомнения. Это возможно, например, в случаях, когда заключение первичной экспертизы противоречит объективно установленным фактам, или оно не согласуется с досто-

верными обстоятельствами дела, или экспертиза сделана без учета относящихся к предмету экспертизы фактов, а также если при назначении или производстве первичной экспертизы были допущены нарушения процессуальных норм, регламентирующих назначение и производство судебных экспертиз. Повторная экспертиза поручается другому эксперту или экспертам.

По численности и составу исполнителей судебные экспертизы подразделяются на *единоличные, комиссионные и комплексные*. Единоличную экспертизу проводит один эксперт, комиссионную — комиссия, состоящая из двух или более экспертов одной специализации. Комплексной является экспертиза, в которой эксперты, специализирующиеся в разных классах или родах судебных экспертиз, заняты совместным решением одних и тех же вопросов и формулированием общего вывода. Выводы, сделанные каждым экспертом самостоятельно, без участия специалистов в иных областях знаний, подписываются им единолично. Выводы по общим вопросам, которых, как правило, в комплексных экспертизах немного, подписываются всеми участвовавшими в проведении экспертизы судебными экспертами. При этом предполагается, что каждый из участников комплексной экспертизы, помимо узкой специализации, обладает знаниями в пограничных областях наук, которые использовались при даче заключения. В принципе, возможно выполнение комплексной экспертизы и одним экспертом единолично, если он обладает специальными познаниями в различных родах и классах судебных экспертиз.

Необходимость классификации судебных экспертиз обусловлена и чисто практическими задачами. Следователь должен четко представлять, к какому классу, роду и виду относится назначаемая экспертиза, так как от этого зависит целесообразность ее назначения, круг решаемых вопросов, выбор экспертного учреждения и конкретного эксперта. И как итог всего этого — использование результатов экспертизы при расследовании преступления и в процессе судопроизводства.

От классификации судебных экспертиз зависит и штатная численность сотрудников подразделений. Например, число экспертов-биологов экспертно-криминалистических подразделений (ЭКП)

органов внутренних дел России с внедрением в экспертную практику судебно-генетических экспертиз увеличилась на 20 %. Внедрение новых видов экспертиз требует создание новых технологий, приборной базы, лабораторных помещений и т.д.

1.2. Методологические основы и возможности судебно-генетической экспертизы

Судебно-генетическую экспертизу можно рассматривать как *вид судебных экспертиз*, которая относится к роду экспертиз тканей и выделений человека из класса судебно-биологических экспертиз, с характерными для нее предметом, объектом, методиками и необходимыми экспертными знаниями.

Из истории развития судебно-биологической экспертизы. Главным вопросом судебно-биологической экспертизы был и остается вопрос о происхождении следов на месте происшествий от конкретного лица. Результаты экспертизы обычно сводятся к установлению факта наличия в следах биологического материала (крови, слюны, спермы и др.) и выявлению в них различных групповых факторов.

В середине XIX в. Людвиг Тейхман-Ставларский впервые открыл доказательный метод установления наличия крови в следах с помощью химической реакции (раствора поваренной соли и ледяной уксусной кислоты), а в конце XIX в. немецкие ученые Р. Бунзен и Г. Киргоф разработали надежный метод установления наличия крови с помощью спектроскопии.

В то время сам факт установления следов крови на одежде подозреваемого рассматривался как доказательство его вины в совершении преступления. Французские ученые Флоренс и Фрикон систематизировали виды следов крови в зависимости от механизма их образования, что в совокупности с методом установления наличия крови в этих следах придавало исследованиям большую доказательственную силу.

Однако со временем сторона защиты сочла эти факты недостаточными, и судебная медицина стала искать другие способы исследования следов крови. Очень важно было решить вопрос о проис-

хождении крови (от человека или животного). Первые опыты проводились на жидкой крови, видовую принадлежность которой устанавливали по наличию, размеру и форме ядер в клетках. Однако эти методы не были пригодны для исследования следов крови. Решить проблему удалось только в 1899 году, когда русский исследователь-патологоанатом Федор Яковлевич Чистович открыл реакцию преципитации, а Пауль Уленгут использовал это открытие для установления видовой принадлежности крови.

В 1901 году в журнале «Немецкий медицинский еженедельник» была опубликована работа Пауля Уленгута о новом методе определения наличия человеческой крови. Работа называлась «Метод определения различных видов крови и дифференциально-диагностическое доказательство наличия человеческой крови». Работа была короткой и скромной, но именно в ней говорилось о величайшем открытии, имевшем место в истории судебной медицины на рубеже XIX и XX столетий.

Этот метод начал широко применяться и стал неотъемлемой частью любого исследования при проведении экспертиз следов крови, но и его со временем оказалось недостаточно для доказывания факта принадлежности следов конкретному лицу. Как утверждали адвокаты: если доказано, что следы крови произошли от человека, то чем эта кровь отличается от крови миллионов других людей, каждый из которых мог оставить эти следы. И конечно, были абсолютно правы.

Открытие Карлом Ландштейнером трех групп крови системы АВ0, а позднее Эмилем фон Дунгерном еще одной группы этой системы легло в основу практических экспериментов М. Рихтера в области установления групп крови в следах. Внедрение в практику методики установления групповой принадлежности крови в следах на вещественных доказательствах позволило делать выводы о возможности (или невозможности) происхождения пятен крови от определенного лица.

Особенно важным являлось то, что стало возможным исключать происхождение крови от конкретного человека. Совпадение групповой принадлежности имело значение лишь в сумме доказательств, так как нельзя категорично утверждать о происхождении

крови именно от данного человека, а не от других лиц с такой же группой крови. Вскоре стало очевидным, что в большинстве случаев четыре группы крови системы АВ0 не дают возможность исключить (или подтвердить) происхождение следов от конкретного человека, поэтому судебные медики искали другие системы групп крови.

История развития судебно-биологической экспертизы шла по пути «открытия» новых систем, установление которых в биологическом следе и решает вопрос его происхождения от конкретного человека. Однако не все системы имеют равноценное прикладное значение, что зависит от количества признаков, входящих в каждую из них, и распределения этих признаков в различных популяциях. Чем больше систем исследуется в следе, тем с большей долей вероятности можно установить его происхождение, но слишком малые размеры следа и его состояние не позволяют этого сделать.

Революционным достижением, которое принципиально по-новому позволило подойти к проблеме идентификации биологического следа, стало *применение методов анализа ДНК*, позволяющих исследовать непосредственно молекулу ДНК, кодирующую все биологические признаки человека.

Первым человеком, который догадался, каким образом можно идентифицировать личность с использованием методов молекулярной генетики, был английский профессор Алек Джеффрис (Alec Jeffreys), опубликовавший в июле 1985 года в журнале "Nature" свою статью «Индивидуально-специфичные "отпечатки пальцев" ДНК человека».

Термин «отпечатки пальцев» был употреблен им, конечно, иносказательно и к традиционной дактилоскопии отношения не имеет. Описанный Джеффрисом метод основан на способности бактериальных ферментов распознавать строго определенные последовательности ДНК и разрезать ее по областям распознавания. Данный факт был известен давно, однако английский ученый *впервые обнаружил*, что длина



Алек Джеффрис
(Alec Jeffreys)

образующихся фрагментов различается у разных людей, отсюда и принятое название данного метода – полиморфизм длины фрагментов рестрикции (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism).

Это открытие легло в основу внедрения методов молекулярной генетики в практику судебно-генетической экспертизы вещественных доказательств, позволяющих проводить идентификационные исследования объектов биологического происхождения.

Методологические основы судебно-генетического исследования. К методологическим основам любого вида экспертизы относится ее понятийный аппарат, система принятых в ней классификаций, учение о методах исследования, ее идентификационные возможности. Исходя из этих основополагающих моментов изучения методологических аспектов мы и будем рассматривать *судебно-генетическую экспертизу*.

Методологические основы судебно-генетического исследования включают изучение основных структурных единиц молекулы ДНК, сложных процессов наследования и передачи генетических признаков от родителей к детям и многие другие вопросы и проблемы, связанные с генетикой. В связи с этим экспертизу смело можно называть *генетической*.

При проведении этой экспертизы применяются *методы* генетического анализа, с помощью которых, как правило, исследуются наследственные свойства организма. Исследование проводят на различных уровнях: клеточном, молекулярном, популяционном и др. в зависимости от сложности и цели поставленных задач.

Предметом изучения судебно-генетической экспертизы являются полиморфные генетические признаки дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) генома человека. Особенностью данных признаков является то, что по отдельности они не являются уникальными для конкретного индивидуума, т.е. эти признаки обычно присущи группе людей. В совокупности эти признаки позволяют индивидуализировать объект исследования и решить главную задачу экспертизы.

Объектами исследования в судебно-генетической экспертизе являются любые ткани и выделения человека, которые содержат ДНК. К таким тканям и выделениям относятся жидкая кровь и пят-

на высохшей крови, слюна, сперма, пот, мышечные и костные ткани, корневые концы волос с луковицей.

Судебно-генетическая экспертиза – это *сравнительная* экспертиза, проводимая с целью установления генетической идентичности или различий исследуемых объектов.

Главной задачей судебно-генетической экспертизы является идентификация источника происхождения биологических следов от конкретного лица, чьи генетические признаки в процессе исследования сравниваются с генетическими признаками объекта, происхождение которого неизвестно.

Для этого используют два *основных методических подхода*. Один из них – так называемая *прямая идентификация* – состоит в непосредственном сравнении идентифицирующих характеристик (в нашем случае это профили ДНК) объекта идентификации с идентифицирующими характеристиками объектов сравнения из базы данных.

Применение прямого сравнительного исследования генетических признаков изучаемого объекта и генетических признаков образца крови лица, от которого предполагается происхождение объекта, обычно проводится по делам, когда на месте происшествия обнаруживаются и изымаются следы биологического происхождения человека и определено лицо или круг лиц, от которых данные следы предположительно происходят.

Другой метод ДНК-идентификации – не прямой, а *опосредованный*. Судебно-генетическая экспертиза в отличие от любых других экспертиз позволяет решать задачу идентификации объекта, не применяя прямого сравнительного исследования, а проводя сравнение с генетическими признаками ближайших родственников. Это – идентификация, осуществляемая посредством установления факта кровного родства. Расчетные алгоритмы данного метода опираются на закономерности наследования признаков от родителей к детям.

Подобные исследования очень часто проводятся при идентификации останков неопознанных трупов, которые не могут быть идентифицированы традиционными и антропометрическими методами. В этих случаях задача идентификации может быть решена

путем сравнения генетических признаков останков с генетическими признаками предполагаемых родителей или детей погибшего.

Эта задача может быть решена также путем сравнения генетических признаков митохондриальной ДНК (мтДНК) останков с генетическими признаками предполагаемых сестер или братьев, а также родственников по материнской линии (бабушкой, родными братьями и сестрами матери или бабушки).

Кроме задач по идентификации объектов, генетическая экспертиза может решить *задачу установления родства*, в частности отцовства или материнства. Такие исследования проводятся как по уголовным делам, связанным с детоубийствами или подменой детей, так и в гражданских делах по разрешению спорного отцовства.

Последней задачей, решаемой генетической экспертизой является *диагностика пола* исследуемого объекта. Для исследования признака половой принадлежности, как и любого генетически детерминированного признака, не характерны какие-либо технологические особенности. Поэтому половая принадлежность исследуемого объекта диагностируется обычными методами ДНК-анализа.

Возможности судебно-генетической экспертизы. Методы ДНК-анализа позволяют исследовать *микроколичества биологического материала*. Теоретически минимальной величиной объекта, пригодного для исследования методами ДНК-анализа, может быть лишь одна клетка, однако, практически объект должен состоять как минимум из десятков или сотен не разрушенных клеток. Такая величина соответствует настолько незначительным размерам, что нередко пригодные для исследования объекты остаются не обнаруженными на месте происшествия. Например, 1 мкл цельной крови (1/30 величины минимальной по размерам капли) содержит около 50 нг ядерной ДНК, что в 50 раз превышает количество ДНК, необходимое для проведения генетического исследования.

Судебно-генетическая экспертиза позволяет исследовать следы, содержащие ДНК двух и более лиц, при этом существуют возможности разделения ДНК разных лиц (например, исследуются следы спермы смешанные с выделениями потерпевшей), так и возможности анализа смешанных профилей ДНК.

В процессе исследования изучаются конкретные генетические маркеры (полиморфные локусы ДНК). Сохраненные результаты исследования ДНК пригодны для систематизации, что особенно важно при формировании криминалистических учетов, когда необходимо накопление и сохранение данных исследования следов для последующего поиска подозреваемых лиц путем сравнения их данных с уже имеющимися в базе.

Принципиальная возможность создания баз ДНК расширяет возможности судебно-генетической экспертизы в случаях расследования преступлений, когда у следствия отсутствуют лица, причастные к совершению данного преступления.

Судебно-генетическая экспертиза относится к категории наиболее динамично развивающихся, и, не исключено, что появление принципиально новых методик исследования структуры ДНК потребует дальнейшей классификации уже судебно-генетических экспертиз.

Контрольные вопросы

1. Что такое экспертиза?
2. Дайте определение судебной экспертизы.
3. Какие задачи решает судебная экспертиза?
4. Как классифицируются экспертизы?
5. В каких случаях назначается дополнительная экспертиза?
6. Что такое первичная и повторная экспертизы?
7. Дайте определение эксперта.
8. Что является главным вопросом судебно-биологической экспертизы?
9. Перечислите главные вехи в истории развития судебно-биологической экспертизы.
10. Что относится к методологическим основам генетического метода исследования?



2. ОСНОВНЫЕ ПРИЕМЫ И МЕТОДЫ ИЗЪЯТИЯ ОБЪЕКТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

2.1. Поиск объектов биологического происхождения при осмотре места происшествия

Осмотр – следственное действие, представляющее собой непосредственное обследование места происшествия (местности, помещений), предметов, документов в целях обнаружения, восприятия и исследования дознавателем (следователем) следов преступления, других вещественных доказательств, их признаков, свойств, состояния, выяснения обстановки происшествия, а равно иных обстоятельств, имеющих значение для дела, а также последующее закрепление полученных данных в материалах дела.

Результаты осмотра могут стать основаниями возбуждения дела. Поэтому осмотр места происшествия проводится или до возбуждения уголовного дела в случаях, не терпящих отлагательства, или после возбуждения уголовного дела и с участием понятых.

Цель осмотра. Основная цель осмотра места происшествия – поиск следов преступления (действий преступника), помогающих установить как его личность, так и механизм преступления.

Системно-структурный подход к следственному осмотру позволяет сформулировать некоторые рекомендации по его организации и проведению, что позволяет целенаправленно проводить поисковые мероприятия с целью обнаружения и изъятия объектов биологического происхождения.

Рекомендуется сначала определить *границы осмотра* и лишь потом начинать его. Предварительное определение границ места происшествия осуществляется на основании данных, полученных в процессе опроса потерпевшего, очевидцев происшествия или лиц, первыми обнаруживших последствия происшествия.

Данный опрос не дает исчерпывающей информации о происшедшем, не всегда позволяет сразу и четко определить границы осмотра. Но он дает возможность сориентироваться в ситуации и наметить первоначальные операции, обозначить следы или предметы, которые могли остаться на месте происшествия или которые

необходимо искать. Сведения о характере преступления могут оказаться полезными и для того, чтобы определить, где прежде всего следует искать те или иные следы.

Помимо этого, поисковую ценность и доказательственную значимость для расследования в целом имеют и следы на отдельных участках места происшествия, где взаимодействие лиц было самым интенсивным, что повлекло образование объектов биологического характера.

Поиск следов биологического происхождения. Эта процедура во многом схожа с поиском традиционных следов, но имеет и свои особенности, связанные со специфическими свойствами таких объектов, как кровь, сперма, запаховые следы и пр. Поэтому непосредственный поиск и обнаружение объектов биологического происхождения осуществляется на стадиях *общего* и *детального осмотров*.

В зависимости от характера преступления, внешней обстановки объекты биологического происхождения могут встречаться в разных местах на различных носителях.

Обнаружение объектов биологического происхождения начинается с визуального осмотра предметов. Осмотр необходимо проводить как при естественном, так и при искусственном косопадающем освещении. Осмотр при искусственном косопадающем освещении позволяет обнаружить старые следы крови, потожировые наслоения в виде следов рук, слабовидимые наслоения, образованные слюной, спермой.

Поиск следов преступника (крови, слюны, волос и др.) в помещениях касается в первую очередь *предметов* – наиболее вероятных носителей таких следов. Они могут концентрироваться, например, на орудиях преступления, посуде, окурках, предметах, принадлежащих потерпевшему, но обнаруженных в несвойственных им местах или на предметах, утерянных преступником во время борьбы (пуговицы, расчески и пр.).

Преступник мог оставить следы крови, волосы, волокна одежды, частицы почвы и т. п. на различных предметах не только вследствие борьбы с потерпевшим, но и в момент повреждения и взлома преград помещений. Поэтому при осмотре следует вести поиск таких следов в местах возможного проникновения в помещения и ухода из них.

С учетом конкретных обстоятельств дела необходим поиск крови и потерпевшего. При тщательно замаскированных преступлениях, зачастую связанных с расчленением трупа, преступник старается уничтожить следы крови потерпевшего, смывая их водой. В таких случаях желательно участие в осмотре *специалиста-биолога*.

В большинстве случаев носителями следов являются орудия преступления, элементы окружающей среды – почва, растения.

Для осмотра местности целесообразно привлечь кинолога с розыскной собакой. Это поможет ограничить территорию осмотра (выделить пути прихода и ухода с места преступления), облегчит поиск следов, относящихся к преступному событию, а в некоторых случаях, когда место обнаружения трупа не является местом совершения преступления, будет способствовать его установлению.

Специфика следов биологического происхождения. Источником следов биологического происхождения является тело человека, его органы, поэтому следы биологического происхождения несут розыскную информацию, направленную на установление подозреваемых. Они могут быть образованы кровью, спермой, потом, слюной, вагинальными выделениями и т.д. К ним относятся также волосы, органы и ткани человеческого организма, кости и их фрагменты. Особое место среди объектов биологического происхождения занимают запаховые следы человека.

Во время осмотра места происшествия лицо, проводящее осмотр, должно уяснить структуру и обстановку места происшествия, выявить *узловые элементы обстановки*, например: участок проникновения, труп и его ложе. На этом этапе можно выявить видимые следы биологического происхождения (например, следы крови) или выдвинуть предположения об этом, а также *выделить те объекты или участки*, где необходимо провести поисковые мероприятия для обнаружения вещества биологического происхождения.

Анализ уголовных дел свидетельствует, что изнасилования, большинство случаев причинения телесных повреждений, убийства сопровождаются, как правило, активным физическим взаимодействием преступника и потерпевшего. Результат таких контактов

– наличие объектов биологического характера на одежде и теле как потерпевшего, так и преступника.

Особенностью объектов биологического происхождения является то, что установление источника их происхождения основано на анализе компонентов, биологическая активность которых утрачивается под воздействием: временного фактора, контакта с внешней средой (влажность, температура, солнечный свет и пр.).

Претерпевая деструктивные (в том числе гнилостные) изменения, такие объекты утрачивают видовые, групповые, индивидуализирующие, половые и иные признаки. Это делает невозможным их использование и для решения идентификационных задач, стоящих перед судебно-биологической экспертизой.

Способность к самоуничтожению объектов биологического происхождения негативно отражается на получении как поисковой, так и доказательственной информации, необходимой для следствия.

Кроме того, объекты биологического происхождения зачастую малозаметны и с течением времени меняют свои свойства, «растворяются» в массе других следов, поэтому для их поиска и закрепления требуются специальные познания, технические приемы и средства. Но даже применение обычных источников освещения (лампы, фонаря и т. п.), направленных под углом относительно рассматриваемой поверхности, может существенно повысить эффективность поиска следов.

От того, насколько правильно и своевременно проведены осмотр места происшествия, поиск, фиксация и изъятие объектов биологического происхождения, зависит их пригодность для дальнейшего исследования и возможность их использования для решения идентификационных задач.

Встречаются случаи попыток уничтожения следов на месте происшествия, однако, как показывает экспертная практика, полностью это не удастся. Кроме того, эти следы крови, спермы бывают столь малы, что их обнаружение без специальных средств затруднено. К техническим средствам, позволяющим выявить такие следы, а также невидимые при визуальном осмотре микрообъекты, в том числе и биологической природы, относятся: лупа с подсвет-

кой, криминалистическая лупа; осветительные приборы; переносные источники ультрафиолетового излучения; осветители с автономным электрическим питанием или с питанием от электрической сети.

Помещение, где проводят осмотр, затемняют и на пятна предполагаемой крови, спермы, слюны направляют ультрафиолетовые лучи. Кровь, к примеру, поглощает эти лучи и выявляется в виде темных «бархатных» пятен.

При обнаружении микрообъектов биологической природы они изымаются вместе с предметом-носителем или его частью и в упакованном виде направляются в лабораторию.

При комплектовании чемодана для работы с объектами биологического происхождения требуются следующие инструменты и реактивы: ножницы, препаровальные иглы, скальпели; набор инструментов (ножовка, отвертки, стамеска, пассатижи и др.); фонарик; пинцеты; канцелярская пленка с липким слоем; нестерильные марля или бинт; пластинка из оргстекла; препараты для предварительного обнаружения крови; флакон с чистой водой, дозатор для воды; флакон со спиртом для дезинфекции рук и инструмента; перчатки и т.д. (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Криминалистический биологический чемодан

2.2. Предварительные исследования объектов биологического происхождения

Предварительные исследования объектов биологического происхождения – это способ установления (диагностики) с помощью научно-технических средств родовой принадлежности обнаруженных следов крови, спермы без их уничтожения.

В настоящий момент используют предварительные пробы для установления присутствия двух видов объектов биологического происхождения, а именно – крови и спермы. Для обнаружения других объектов биологического происхождения используется лишь оценка внешнего вида (например, волосы), цвета (потожировые наслоения, слюна), запаха (запаховые следы), характера наслоений (потожировые наслоения) и ситуационные особенности (запаховые следы). Выявленные в ходе предварительных исследований предполагаемые следы биологического происхождения в дальнейшем должны быть направлены на судебно-биологическую экспертизу.

Выявление следов крови. Следы крови имеют различные оттенки: от ярко-красного цвета жидкой крови до бурого, коричневого, красно-оранжевого цветов, иногда с сероватым оттенком. В случае ее загнивания появляются включения черного, зеленого, серого и белого цветов.

При визуальном осмотре предметов с целью обнаружения следов крови следует учитывать, что кровь на предмете может находиться в виде наслоений-«корочек», которые легко отделяются от поверхности и могут быть утеряны вследствие неаккуратного обращения с предметом осмотра. Кроме того, обнаружение крови на предмете может быть затруднено не только необычной окраской самого пятна крови, но и окраской предмета-носителя. Так, пятно крови может сливаться по цвету с предметом, на котором оно находится. Иногда сложно вычленить пятно крови из общего рисунка поверхности: оно как бы сливается с рисунком предмета-носителя. Наиболее часто такие ситуации случаются при поиске небольших по размеру пятен в виде брызг на стенах, оклеенных обоями со сложными многоэлементными рисунками, или на обивочной ткани мягкой мебели.

Нельзя упускать из виду и тот факт, что преступник часто пытается уничтожить следы крови на месте происшествия, на собственной одежде. Поэтому при осмотре особое внимание необходимо уделять тем участкам поверхности, где возможно скопление крови. Например, в результате замывания крови она может остаться в щелях между половыми досками, в углублениях, трещинах поверхности, в стыках и соединениях предметов обстановки, в материале утеплителя одежды, нитках швов обуви.

Для выявления следов крови на месте происшествия используют многие реакции в качестве предварительных проб. Например:

1) 3 %-ный раствор перекиси водорода (H_2O_2) наносят на самый край исследуемого пятна. При наличии крови наблюдают появление «бугорка» пены белого цвета как результат действия фермента каталазы, содержащейся в форменных элементах крови;

2) диагностические полоски гемо-ФАН (фирма Lachema, Чехия) с реагентом (предварительно увлажненную водой) накладывают на край пятна предполагаемой крови полоску. Окрашивание полоски в синий цвет считается положительным результатом реакции;

3) в ультрафиолетовых (УФ) лучах пятно крови приобретает коричневый цвет и не флюоресцирует. Если же на частичку крови (например, на нить с пятном крови) нанести каплю концентрированной серной кислоты, то в УФ-лучах пятно приобретет ярко-красное свечение. Гемоглобин крови под воздействием серной кислоты переходит в гематопорфирин, который дает флюоресценцию красного цвета.

Выявление следов спермы. Следы спермы имеют белый цвет с желтоватым оттенком. На ощупь участок ткани, пропитанный веществом спермы, более плотный (жесткий), чем сама ткань. При осмотре с целью обнаружения следов спермы следует особое внимание уделять предметам обстановки, на которых по данным потерпевших или свидетелей был совершен акт изнасилования.

Предварительная проба на сперму основывается на выявлении в пятнах кислой фосфатазы. Для этого используют индикаторные полоски, например, «Фосфотест». Индикаторный слой, пропитанный реагентом, смачивают водой и прижимают с краю исследуемого пятна. При наличии спермы через 20–30 с наблюдается яркая

фиолетовая окраска подложки. В УФ-лучах сперма флюоресцирует ярко-голубым светом за счет содержащегося в ней флавина. Следы спермы, смешанные с кровью, не флюоресцируют.

Выявление следов слюны. Следы слюны имеют сероватый или желтоватый оттенок. Однако окурки сигарет, папирос и фрагменты бумаги, которыми закрывают дверные «глазки», следует всегда изымать и направлять на дальнейшее исследование, даже если нет видимых следов слюны.

Выявление потожировых следов. О наличии потожировых наслоений свидетельствуют блестящие участки ткани – так называемые участки засаленности, а также обнаруженные дактилоскопическими методами следы рук или иных частей тела.

Существуют различные дактилоскопические методы обнаружения следов рук или иных частей тела. Из них неразрушающими для вещества потожировых наслоений является только методы специального освещения и оптического увеличения, осаждения копоти и метод опыления цветными порошками и их смесями, в то время как другие методы оказывают на вещество потожировых наслоений то или иное разрушающее воздействие, исключающее возможность дальнейшего биологического исследования данных следов.

Выявление волос и волокон. Если при осмотре места происшествия или предметов обнаруживаются наложения в виде волокон, то они обозначаются как «объекты волокнистой природы», изымаются и направляются на исследование с целью установить их принадлежность к волосам.

Выявление запаховых следов. Запаховые следы на данный момент приборами не детектируются, несмотря на многочисленные попытки создать технические детекторы запаха, так как чувствительность таких приборов крайне низка. Предположения о наличии таких следов выдвигаются на основании логической оценки обстановки и ситуации.

Прежде всего, следует помнить, что кровь является одним из лучших носителей индивидуального запаха. Если на месте происшествия найдены следы крови, которые могли произойти от преступников, или на одежде подозреваемых имеются следы крови, которые могли произойти от потерпевших, то они могут быть изъя-

ты с целью получения запаховых проб, которые в дальнейшем используются для проведения идентификационных экспертиз.

2.3. Фиксация следов описанием в протоколе осмотра

В соответствии с требованиями уголовно-процессуального закона следы, обнаруженные при осмотре места происшествия, а также при иных видах осмотров, необходимо *детально описать* в протоколе.

В связи с этим основным и обязательным способом фиксации объектов биологического происхождения является их *описание* в протоколах следственных действий. Оно заключается в полном и четком отражении в письменном виде всего обнаруженного в ходе осмотра. При этом закон требует отражения объектов (предметов и следов) в том виде, в каком они наблюдались.

Для объектов биологического происхождения это требование очень важно, так как они меняют свои свойства и признаки под влиянием окружающей среды, времени и действий человека. Поэтому в протоколе следственных действий необходимо указывать время обнаружения следов (кроме времени начала и окончания следственного действия) и их физическое состояние на момент обнаружения. Это связано с тем, что в процессе следственного действия оно может измениться – пятна крови и спермы могут высохнуть, изменить свой цвет, разрушиться (осыпаться), на влажные следы спермы, потожирового вещества участниками осмотра могут быть привнесены посторонние загрязнения.

Указание цвета и физического состояния биологических следов позволяет определить время их образования. Несмотря на то, что точно время образования следов крови определить невозможно, по этим признакам устанавливается *относительная последовательность* образования следов крови – какие следы появились раньше, какие позже.

Ярко-красный цвет жидкой крови наблюдается в течение нескольких минут, потом она становится красновато-коричневой с буроватым оттенком или бурой (до трех дней). Спустя месяц кровь

может приобрести коричневый цвет, а примерно через два месяца — приобрести сероватый оттенок, иногда измениться на черный цвет. Загнивая, следы крови приобретают зеленоватый оттенок.

В *протоколе* следственного действия должны быть отражены следующие данные:

- время, место обнаружения следов биологического происхождения или их объектов-носителей (например, окурки сигареты) и температура воздуха;

- ориентация следов по взаимному расположению, по отношению к другим предметам обстановки и предполагаемому источнику следов (например, относительно трупа на месте происшествия);

- состояние предметоносителя (сухой или мокрый, наличие посторонних загрязнений) и вид следовоспринимающей поверхности;

- цвет и физическое состояние следа (сухой, жидкий, влажный);

- форма, размеры следа;

- динамическая характеристика следа (образован след каплей, брызгами или потоком крови, направление движения вещества крови);

- радиус распространения следов;

- какая проба предварительного обнаружения крови или спермы применялась при производстве следственного действия, ее результат, на каких предметах и следах применяли данную пробу.

Дополнением к протоколу следственного действия могут выступать фото- и видеосъемка, выполнение схем, планов, рисунков. О проведении этих мероприятий должна быть сделана запись в протоколе следственных действий.

После обнаружения и фотофиксации следов, детального описания их в протоколах осмотра *объекты биологического происхождения изымают*. Все действия по изъятию должны быть согласованы со следователем, так как он является единственным лицом, уполномоченным законом принимать решения об изъятии того или иного предмета, следа. При выборе среди средств, методов изъятия и упаковки рекомендуется учитывать мнение специалиста в условиях реальной следственной ситуации о характере следов и их состоянии. Причем при выборе метода изъятия специалисту необходимо помнить, что чем меньше он повреждает след, тем больше

информации будет сохранено для дальнейшей работы. Специалист должен всегда стараться изыскать возможность изъятия объектов биологического происхождения в нативном (природном) виде.

Требование о просушивании изымаемых объектов при комнатной температуре является основным при упаковке биологических объектов. Нарушение данного требования ведет к потере изъятых объектов. Просушивание объектов биологического происхождения при высоких температурах приводит к температурному разрушению веществ биологического происхождения. Упаковка во влажном виде приводит к возникновению процесса гниения, и, следовательно, к порче или уничтожению объектов биологического происхождения.

Кроме внешних условий хранения, для объектов и следов данной категории весьма значимым является фактор времени. Причем он выражается не только и не столько в требованиях по срокам проведения следствия, сколько в том, что вещество следов биологического происхождения разрушается со временем, при каких бы самых благоприятных условиях не осуществлялось их хранение. В идеале изъятые объекты должны в течение одного-двух дней направляться на экспертное исследование.

Если к моменту назначения экспертизы (по следам крови, спермы, слюны и т.д.) имеется подозреваемое лицо, то вместе с изъятием при осмотре места происшествия объектами на исследование должны быть направлены и образцы крови или слюны потерпевшего и подозреваемого (только живых лиц).

Контрольные вопросы

1. Что такое осмотр?
2. Какая основная цель осмотра?
3. Охарактеризуйте следы биологического происхождения.
4. Назовите особенность биологических объектов.
5. Что такое предварительные исследования объектов биологического происхождения?
6. Как можно выявить следы крови, спермы?
7. Что должно быть отражено в протоколе ?

3. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОГО ДНК-АНАЛИЗА

3.1. Строение и свойства молекулы ДНК

Строение молекулы ДНК. *Дезоксирибонуклеиновая кислота* (ДНК) является носителем генетической информации обо всех признаках организма и представляет собой сложное высокомолекулярное соединение, состоящее из последовательности химически связанных между собой нуклеотидов.

Разнообразие молекул ДНК обусловлено возможным разнообразием комбинаций расположения нуклеотидов, количество которых в молекуле ДНК достигает порядка *трех миллиардов*.

Общая длина молекулы ДНК клетки человека превышает 1,5 м. ДНК за возможность создавать практически неограниченное количество вариантов получила название «беспредельно варьирующего полимера».

Таким образом, по своему строению ДНК является *сложным полимерным соединением*. Размер молекул ДНК, как и любых других полимерных соединений, может сильно изменяться. Так как мономерные соединения в ДНК – это нуклеотиды, а ДНК – двухцепочечная структура, то размер молекул ДНК принято измерять в *парах нуклеотидов* (п.н.) или *парах оснований* (п.о.).

Каждый *нуклеотид* включает в себя азотистое основание, состоящее из атомов углерода и азота, пятиуглеродное сахарное кольцо (дезоксирибозу) и остаток фосфорной кислоты или фосфатную группу (рис. 3.1).

Азотистые основания делятся на два типа: пуриновые и пиримидиновые. Пурины имеют по два конденсированных кольца: одно – пятичленное, другое – шестичленное. Пиримидины состоят из одного шестичленного кольца (рис. 3.2). Азотистые основания соединены с дезоксирибозой гликозидной связью, которая в случае пиримидинового основания образуется между первым атомом пентозного кольца и третьим атомом основания, а в случае пуринового основания – между первым атомом пентозного кольца и девятым атомом основания. Данное соединение (т.е. соединение, состоящее из азотистого основания и сахара) называется *нуклеозидом*.

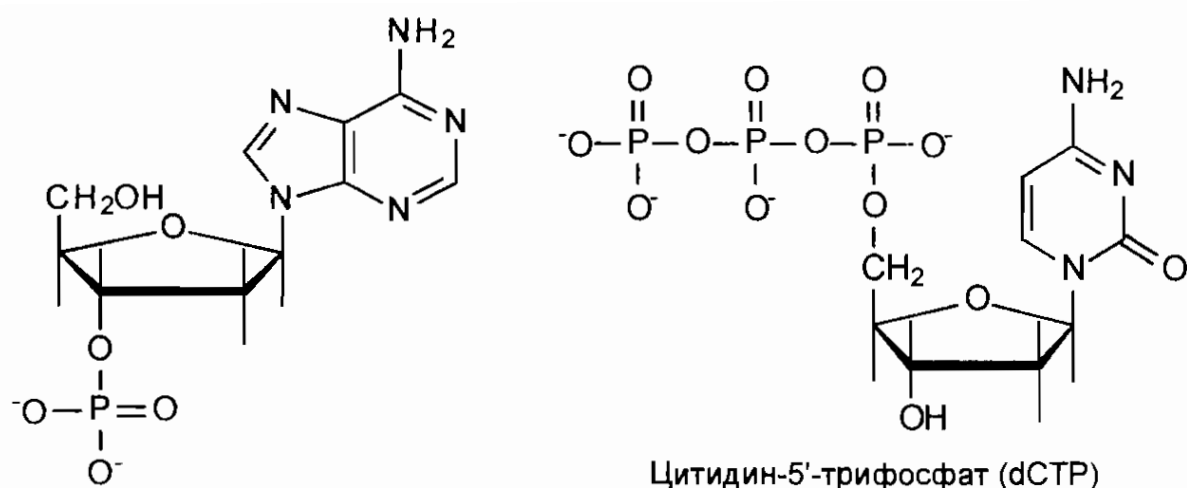


Рис. 3.1. Строение нуклеотидов. Показано, что остаток фосфорной кислоты может находиться в нуклеотидах в 3'- или 5'-положении

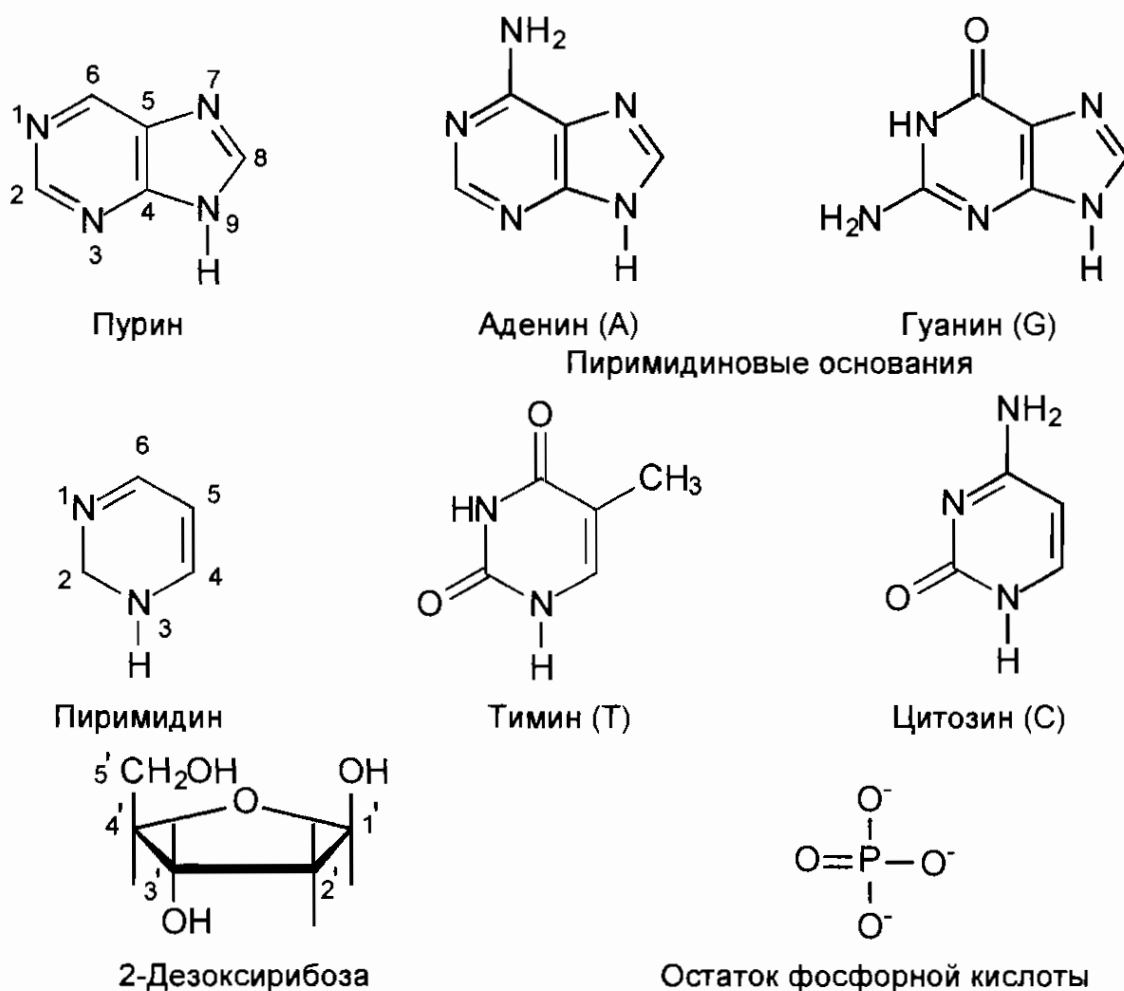


Рис. 3.2. Компоненты ДНК: пуриновые и пиримидиновые основания, дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты. Показана нумерация положения атомов в молекулах азотистых оснований и дезоксирибозы

Чтобы отличить атомы дезоксирибозы от атомов азотистых оснований, их положение принято обозначать номером со штрихом (...'). Остаток фосфорной кислоты может образовывать связь с пентозным кольцом нуклеозида в *двух положениях*: с 3'-атомом или с 5'-атомом. Соответственно, возможны два варианта соединений: нуклеозид-3'-монофосфат и нуклеозид-5'-монофосфат.

Нуклеозиды в 5'-положении могут быть связаны более чем с одним остатком фосфорной кислоты, образуя ди- или трифосфаты. Особенностью этих соединений является то, что связи между фосфатными группами являются *высокоэнергетическими*, т.е. при их разрыве освобождается значительное количество энергии, которая может быть использована для различных клеточных процессов.

Нуклеотиды образуют цепь, остов которой состоит из чередующихся остатков дезоксирибозы и фосфорной кислоты, соединенных фосфодиэфирной связью. Азотистые основания не участвуют в формировании остова цепи. Нуклеотид на одном конце цепи имеет свободную 5'-группу (5'-конец), а на другом – 3'-группу (3'-конец).

Последовательность нуклеотидов (азотистых оснований) принято обозначать в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Именно в этой последовательности закодирована генетическая информация, носителем которой является ДНК.

Модель молекулы ДНК. Согласно модели ДНК, предложенной в 1953 году Уотсоном и Криком, ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, скрученных в спираль (рис. 3.3).

Эти цепи не связаны ковалентно, а соединяются *водородными связями*, возникающими между азотистыми основаниями. При этом А может образовывать водородную связь только с Т, тогда как Г специфически соединяется только с С. Эти реакции называют *спариванием оснований*, а об основаниях, способных спариваться (А с Т и Г с С), говорят, что они *комплементарны*.

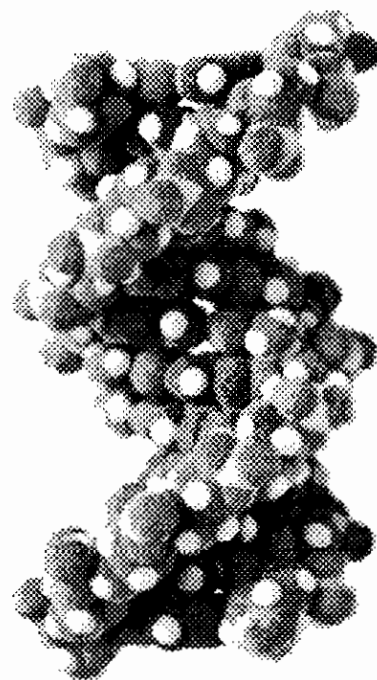


Рис. 3.3. Модель ДНК

При специфическом спаривании оснований между А и Т образуются две водородные связи, а между G и C – три. Азотистые основания имеют плоскую форму и располагаются парами перпендикулярно оси спирали. Если рассматривать спираль вдоль оси, то видно, что одна цепь идет в направлении 5'–3', а другая 3'–5', т.е. *полинуклеотидные цепи в ДНК антипараллельны*. Фосфатные группы располагаются с внешней стороны спирали, имеют отрицательный заряд и требуют нейтрализации ионами металлов или положительно заряженными белками.

Свойства молекулы ДНК. Структура двойной спирали ДНК, скрепленная с помощью только водородных связей, может быть легко разрушена. Разрыв водородных связей между полинуклеотидными цепями ДНК можно осуществить в сильнощелочных растворах (при $\text{pH} > 12,5$) или при нагревании. После этого цепи ДНК полностью разделяются. Такой процесс называют *денатурацией* или плавлением ДНК (рис. 3.4).

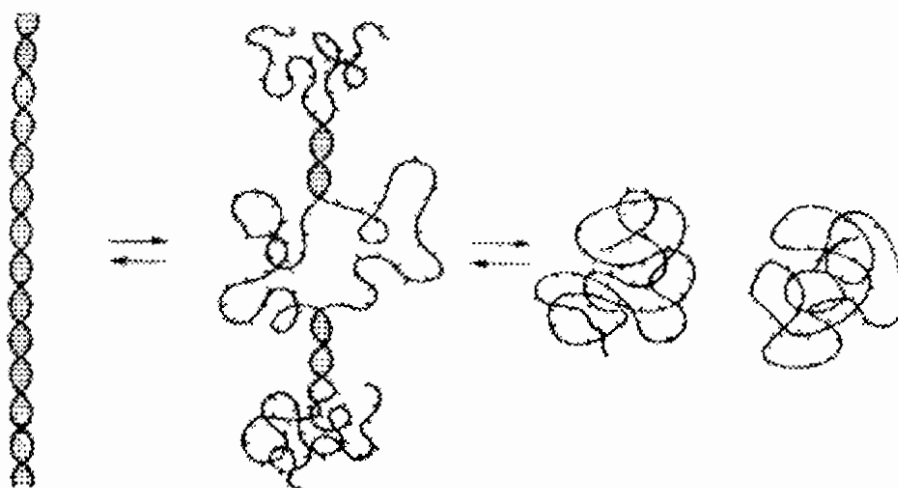


Рис. 3.4. Денатурация ДНК

При денатурации изменяются некоторые физические свойства ДНК, например, ее оптическая плотность. Азотистые основания поглощают свет в ультрафиолетовой области (с максимумом, близким к 260 нм). ДНК поглощает свет почти на 40% меньше, чем смесь свободных нуклеотидов того же состава. Это явление называют *гипохромным эффектом*, а обусловлено оно взаимодействием оснований при их расположении в двойной спирали. Таким образом, за денатурацией ДНК можно наблюдать по изменению ее оптической плотности.

При нагревании ДНК среднюю температуру диапазона, при котором происходит разделение цепей ДНК, называют *точкой плавления* и обозначают как $T_{пл}$. В растворе $T_{пл}$ обычно лежит в интервале 85–95 °С. Кривая плавления ДНК всегда имеет одну и ту же форму, но ее положение на температурной шкале зависит от состава оснований и условий денатурации. Пары G–C, соединенные тремя водородными связями, являются более тугоплавкими, чем пары A–T, имеющие две водородные связи, поэтому при увеличении содержания G–C-пар значение $T_{пл}$ возрастает. Так, ДНК, на 40 % состоящая из G–C (характерно для генома млекопитающих), денатурирует при $T_{пл}$ около 87 °С, тогда как ДНК, содержащая 60 % G–C, имеет $T_{пл}$ около 95 °С.

На температуру денатурации ДНК (кроме состава оснований) оказывает влияние ионная сила раствора. Значение $T_{пл}$ также сильно меняется при добавлении к раствору ДНК таких веществ, как формамид (амид муравьиной кислоты HCONH_2), который дестабилизирует водородные связи. Его присутствие позволяет снизить $T_{пл}$ до 40 °С.

Процесс денатурации является обратимым. Явление восстановления структуры двойной спирали, исходя из двух разделенных комплементарных цепей, называют *ренатурацией* ДНК или *отжигом*. Для осуществления ренатурации, как правило, достаточно остудить раствор денатурированной ДНК.

В ренатурации участвуют две комплементарные последовательности, которые были разделены при денатурации. Однако ренатурировать могут любые комплементарные последовательности, которые способны образовать двухцепочечную структуру. Если совместно отжигают одноцепочечные ДНК, происходящие из различных источников, то формирование двухцепочечной структуры ДНК называют *гибридизацией*.

3.2. Деление и полиморфизм молекулы ДНК

Деление молекулы ДНК. Перед делением клетки молекулы ДНК удваиваются, и дочерные клетки получают точную копию того набора генов, который был у родительской клетки. Чтобы длинные молекулы ДНК не запутались, они свернуты в более плотные структуры, называемые *хромосомами*.

Хромосома представляет собой комплекс, состоящий из одной гигантской молекулы ДНК и множества белковых молекул.

Полный набор хромосом в ядре клетки называется *кариотипом* (от греческих слов карион—ядро и типос—отпечаток). Хромосомы нумеруют по размеру: пара самых больших получила номер 1, следующая — номер 2, и так до 22-й пары. Хромосомы 23-й пары называют половыми, в отличие от остальных, называемых аутосомами. Все яйцеклетки женщины несут одну X-хромосому, в то время как одна половина сперматозоидов мужчины несет X-хромосому, а другая половина несет Y-хромосому.

В половых клетках — яйцеклетках и сперматозоидах — содержится по одной хромосоме из каждой пары, то есть всего 23 хромосомы (в обычных клетках каждая хромосома представлена парой гомологичных хромосом, поэтому общее число хромосом 46).

Во время деления, предшествующего образованию яйцеклетки или сперматозоида, каждая хромосома находит свою пару и плотно прижимается к ней. Затем хромосомы обмениваются фрагментами друг с другом и расходятся по образующимся при делении клеткам. Порядок генов в хромосомах при этом не изменяется. Этот процесс называется *рекомбинацией*. Если бы не было рекомбинации, ребенок получал бы от родителя целиком каждую хромосому, полученную тем, в свою очередь, от его родителей, то есть от бабушки или дедушки. Из-за рекомбинации бабушкины гены каждой хромосомы перемешиваются с дедушкиными, и у ребенка проявляются новые сочетания признаков. Не участвуют в рекомбинации только половые хромосомы мужчин, так что Y-хромосома передается от отца к сыну из поколения в поколение почти без изменений.

При оплодотворении происходит слияние ядер сперматозоида и яйцеклетки, в результате чего ядро образовавшейся зиготы получает полный диплоидный (двойной) набор хромосом. Если яйцеклетка была оплодотворена сперматозоидом, в ядре которого содержалась X-хромосома, то из зиготы в норме развивается плод женского пола. В случае оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом, несущим Y-хромосому, пол плода будет мужским.

Одна половина хромосом, содержащихся в ядрах соматических клеток каждого человека, получена им от биологической матери, а

другая половина — от биологического отца. Вследствие событий рекомбинации, происходящих на первой стадии мейоза, хромосомы ребенка не являются точными копиями хромосом каждого из родителей, а представляют собой своеобразные «химеры» (смеси).

В момент оплодотворения определяется наследственная информация, которую получает человек. В течение всей его жизни она будет почти без изменений переписываться при каждом делении клеток его тела.

Лишь изредка при копировании нуклеотидных текстов происходят ошибки, например, вместо одного нуклеотида в цепочке оказывается другой, фрагмент ДНК теряется или меняет свое положение в геноме, а иногда появляются вставки, которых не было в исходном тексте. Такие изменения, называемые *мутациями*, могут привести к изменениям структуры белка или регуляторных участков генов, губительным для клетки.

Ген — это участок ДНК, связанный с развитием того или иного признака (цвета глаз, группы крови, уровня развития некоторых способностей, предрасположенности к тем или иным заболеваниям). В генах записан общий план развития организма, определяющий особенности человека как биологического вида, а также информация о множестве индивидуальных различий.

У примитивных организмов, таких как бактерии, гены занимают около 80–90 % всей ДНК. У человека на участки, кодирующие белок, приходится не более 5 % нуклеотидных последовательностей. Остальные участки ДНК содержат информацию о том, как и в каком порядке должны включаться гены.

Совокупность всех генов и межгенных последовательностей нуклеотидов называется *геномом* (от слов ген + хромосома). Общее число генов в геноме человека — около 25 тысяч. Каждый ген связан с формированием одного или нескольких признаков — цвета глаз, формы носа, особенностей обмена веществ, группы крови и многих других. Признак может иметь несколько состояний. Например, цвет глаз может быть карим, серым или голубым, волосы — вьющимися, волнистыми или прямыми и т. д.

Последовательности нуклеотидов, находящиеся в одном и том же месте (*локусе*) на гомологичных хромосомах, но имеющие разный нуклеотидный состав называются *аллелями*.

Совокупность аллельных вариантов локусов, лежащих на одной хромосоме называется *гаплотипом*.

Совокупность аллелей данного индивида по какому-либо локусу или группе локусов называется *генотипом*.

В геноме одновременно присутствуют различные по сложности последовательности ДНК, которые могут быть представлены как одной копией (уникальная ДНК), так и сотнями тысяч копий (высокоповторяющаяся ДНК). Уникальная и повторяющаяся ДНК не существуют в виде непрерывных последовательностей. Оба компонента присутствуют в геноме в виде чередующихся друг с другом отдельных последовательностей. Во многих случаях это чередование имеет определенную регулярность.

В хромосоме последовательности ДНК располагаются линейно, при этом каждая специфическая последовательность (*генетический признак*) занимает определенный участок хромосомы, который называют *локусом*. Локусы, расположенные на близком расстоянии в одной хромосоме, могут наследоваться *сцепленно* друг с другом.

Полиморфизм ДНК. Наличие в популяции нескольких стабильных аллелей одного локуса называется *полиморфизмом*, а такой локус – полиморфным. Каждый генетический признак у одного индивидуума представлен двумя аллелями (так как в геноме каждая хромосома представлена парой гомологичных хромосом): если аллели одинаковые, то такой генетический признак имеет *гомозиготное* состояние, если разные – то *гетерозиготное*. Совокупность аллельных вариантов полиморфных локусов является индивидуальной для каждого человека.

Уникальные последовательности ДНК включают в себя все гены организма, т.е. участки ДНК, в нуклеотидной последовательности которых закодирована определенная генетическая информация. Полиморфизм уникальной ДНК генома обусловлен различиями в *последовательности нуклеотидов разных аллелей одного локуса*. Такой вид полиморфизма называют *полиморфизмом нуклеотидной последовательности*.

Данным видом полиморфизма обладают участки ДНК, кодирующие признаки генетических маркеров, которые в экспертной практике исследуют серологическими методами (например, хорошо известная и широко применяемая система группы крови АВ0).

Одним из наиболее изученных в настоящее время генетических маркеров, обладающих *полиморфизмом нуклеотидной последовательности*, является комплекс белков антигенов лейкоцитов человека HLA (Human Leukocyte Antigen). Исследование генетических признаков системы HLA имеет большое значение в медицинской практике, так как гены этой системы обуславливают признаки гистосовместимости органов и тканей при их трансплантациях, а также связаны с болезнями иммунной системы и некоторыми другими болезнями.

3.3. Основные методы исследования ДНК

Для исследования локусов, обладающих полиморфизмом нуклеотидной последовательности, обычно применяют *метод гибридизации* с аллель-специфичными зондами. Для создания таких зондов должна быть определена нуклеотидная последовательность всех аллелей.

Процессы синтеза аллель-специфичных зондов и оптимизации условий гибридизации являются сложными и дорогостоящими. Это является существенным недостатком исследования уникальных последовательностей в криминалистическом ДНК-анализе.

Исследование полиморфизма нуклеотидной последовательности путем непосредственной расшифровки изучаемых последовательностей (т.е. *методом секвенирования*) также имеет ряд сложностей (например, при исследовании гетерозиготного образца ДНК, содержащего смесь двух различных последовательностей ДНК). Перед этапом секвенирования ДНК последовательности каждого аллеля должны быть выделены из смеси ДНК образца, что бывает нелегко выполнить на практике.

Указанные недостатки сужают возможности использования локусов *уникальных* последовательностей в криминалистическом ДНК-анализе, поэтому направление по их исследованию в настоящее время не является перспективным.

Участки высокоповторяющейся ДНК организованы в геноме в виде тандема многократно повторяющихся коротких последова-

тельностью, т.е. *тандемных повторов*, которые могут быть идентичны или близки по строению.

Участки тандемных повторов обладают высоким уровнем полиморфизма, основой которого является непостоянство числа повторяющихся единиц, что обуславливает различия в длине аллелей одного локуса. Такой вид полиморфизма называют *полиморфизмом длины*.

Локусы тандемных повторов разделяют на две группы: *минисателлитных*, или VNTR-локусов (Variable Number Tandem Repeat – локус с переменным числом тандемных повторов) с длиной повтора *семь и более* пар нуклеотидов, и *микросателлитных*, или STR-локусов (Short Tandem Repeat – локус с короткими тандемными повторами) с длиной повтора *от двух до шести* пар нуклеотидов. Данное разделение связано с особенностями практического использования этих локусов, поэтому является условным.

Интервал длин аллелей VNTR-локусов составляет от 200 до 1 000 п.н. Большинство этих локусов обладает высоким полиморфизмом (например, у локуса D1S80 встречается более 20 аллелей) и соответственно высокими индивидуализирующими свойствами.

Однако в случае исследования ДНК, подвергшейся деградации (разрушению), что очень часто встречается в экспертной практике, им свойственны два существенных недостатка. Во-первых, из-за высокой вероятности деградации аллелей, связанной с их относительно большой величиной, может вообще оказаться невозможным установить аллельную характеристику ДНК. Во-вторых, из-за большой разницы в длине аллелей существует вероятность выявить только один низкомолекулярный аллель и дать ложное заключение о гомозиготности образца ДНК, на самом деле являющегося гетерозиготным, у которого высокомолекулярный аллель подвергся большей деградации. Эти недостатки ограничивают использование VNTR-локусов, и поэтому в настоящее время направление по их исследованию *практически не развивается*.

STR-локусы лишены недостатков, свойственных минисателлитным локусам. Интервал длин аллелей составляет от 100 до 300 п.н., что значительно увеличивает вероятность их сохранения в деградированной ДНК и гарантирует выявление всех аллелей в ге-

терозиготных образцах. По сравнению с VNTR-локусами, STR-локусы обладают меньшим полиморфизмом, однако этот недостаток легко преодолевается за счет возможности проведения анализа *сразу нескольких локусов* в рамках одного цикла исследования. Кроме того, данная возможность позволяет сократить сроки исследования и повысить его чувствительность (исходя из одного и того же количества ДНК, установить не один, а сразу несколько генетических признаков). Все это способствует широкому использованию STR-локусов в криминалистическом ДНК-анализе и обуславливает создание на их основе *баз данных ДНК*.

В настоящее время наибольшее применение получили тетрамерные STR-локусы, у которых длина повторяющейся единицы составляет 4 п.н. Для обозначения аллелей этих локусов, в соответствии с рекомендациями Комиссии по ДНК Международного общества криминалистической генометики (DNA commission of the International Society of Forensic Haemogenetics) применяют «естественную» номенклатуру, согласно которой номер аллеля означает число повторяющихся единиц.

В зависимости от строения STR-локусы разделяют на несколько групп. Например, *простые повторы* – это локусы, у которых повторяющиеся последовательности идентичны, например, локус FESFPS, аллельные варианты которого состоят из последовательности [ATTT], повторяющейся в разных аллелях от 8 до 14 раз: [ATTT]8–14.

Контрольные вопросы

1. Расскажите о строении ДНК.
2. Что такое нуклеотид, что он в себя включает?
3. Что представляла собой модель ДНК, кто ее впервые предложил?
4. Что такое денатурация?
5. Что такое ренатурация?
6. Как происходит деление молекулы ДНК?
7. Дайте определения терминов аллель, локус, ген, генотип, гаплотип.
8. Охарактеризуйте явление полиморфизма ДНК.
9. Перечислите основные методы исследования ДНК.

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЯДЕРНОЙ ДНК

4.1. Технологическая схема исследования ядерной ДНК

Технологическая схема исследования *ядерной ДНК* включает следующие этапы:

- выбор объекта исследования, содержащего ДНК;
- выделение ДНК из объектов исследования;
- количественная и качественная оценка выделенной ДНК;
- полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- электрофоретическое разделение продуктов ПЦР (электрофорез);
- интерпретация полученных данных (установление аллелей, математическая обработка данных, выводы);
- заключение эксперта.

Объекты исследования, содержащие ДНК. Наиболее частыми *объектами* исследования являются кровь, слюна и сперма. Пригодными для исследования являются также образцы мышечной ткани, костные останки и отдельные волосы. Более редкими объектами исследования становятся следы пота, перхоть и др.

Пригодными для исследования являются биологические объекты, загрязненные микрофлорой. При проведении исследований эксперты применяют *видоспецифичные* реагенты, что позволяет получать достоверные результаты исследования ДНК человека. ДНК других организмов не оказывает влияния на результаты исследования, однако при ее высоком содержании она становится ингибитором ПЦР.

Исследование может быть проведено и для биологического материала, произошедшего от двух или более лиц. Например, для объектов, содержащих сперму, используя метод дифференциального лизиса клеток, имеются возможности разделить ДНК спермы и ДНК других выделений и проводить их дальнейшее исследование как изолированных объектов.

Выделение и оценка ДНК, выделенной из исследуемых биологических объектов. Выделение ДНК является важным этапом

экспертизы по исследованию ДНК. Основными методами выделения биологических объектов в настоящее время являются:

- 1) метод, основанный на использовании ионообменной смолы Chelex 100;
- 2) метод выделения и очистки с помощью органических соединений, таких, как фенол и хлороформ (фенольный метод);
- 3) метод выделения и очистки с помощью веществ, абсорбирующих ДНК, таких как соединения кремния (Silica) или синтетические сорбенты.

При выборе метода выделения следует учитывать вид объекта, его состояние, давность образования и условия хранения.

Метод выделения ДНК с использованием Chelex 100 обычно применяют, когда исследуемый объект не содержит больших количеств белков, не подвергался длительному хранению и его клетки легко лизируются. Положительным качеством метода является то, что выделение ДНК этим методом не требует применения токсичных реактивов и проводится в течение относительно короткого времени. Процедура выделения ДНК включает в себя небольшое количество шагов, что потенциально снижает вероятность перекрестной контаминации ДНК между разными объектами. Недостатками метода являются невысокая степень очистки ДНК от белковых примесей, которые могут являться ингибиторами ПЦР и невозможность автоматизации процесса выделения. Ионообменную смолу Chelex 100 обычно применяют при работе с кровью, спермой и слюной (рис. 4.1).

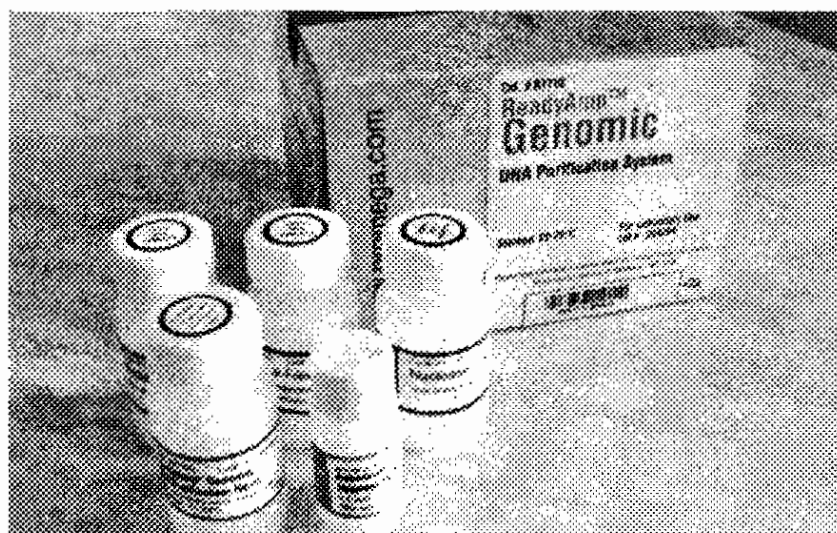


Рис. 4.1. Набор ReadyAmp Genomic DNA Purification System (5% Chelex 100)

Этим методом также допустимо выделять ДНК из волос, пота, перхоти и других объектов. Недопустимыми объектами следует считать зафиксированную или гемолизированную кровь, биологические объекты на предметах-носителях, содержащих ингибиторы ПЦР (красители, гуминовые кислоты и др.), мышечные и костные ткани.

Фенольный метод является универсальным, т.е. данный метод может быть применен для выделения ДНК практически из любых объектов, содержащих ДНК. При использовании этого метода происходит наиболее полное удаление белков и различных клеточных компонентов, в результате чего удается получить ДНК высокой степени очистки, которая пригодна для длительного хранения. К недостаткам метода относятся необходимость применения высокотоксичных реактивов, длительность процедуры выделения ДНК и невозможность автоматизации процесса выделения. Кроме этого, при использовании фенольного метода часть ДНК, содержащаяся в исследуемом объекте, может теряться. Поэтому этот метод особенно эффективен, когда объект содержит относительно большое количество ДНК. Фенольный метод является традиционным для выделения ДНК из костных и мышечных тканей (рис. 4.2).

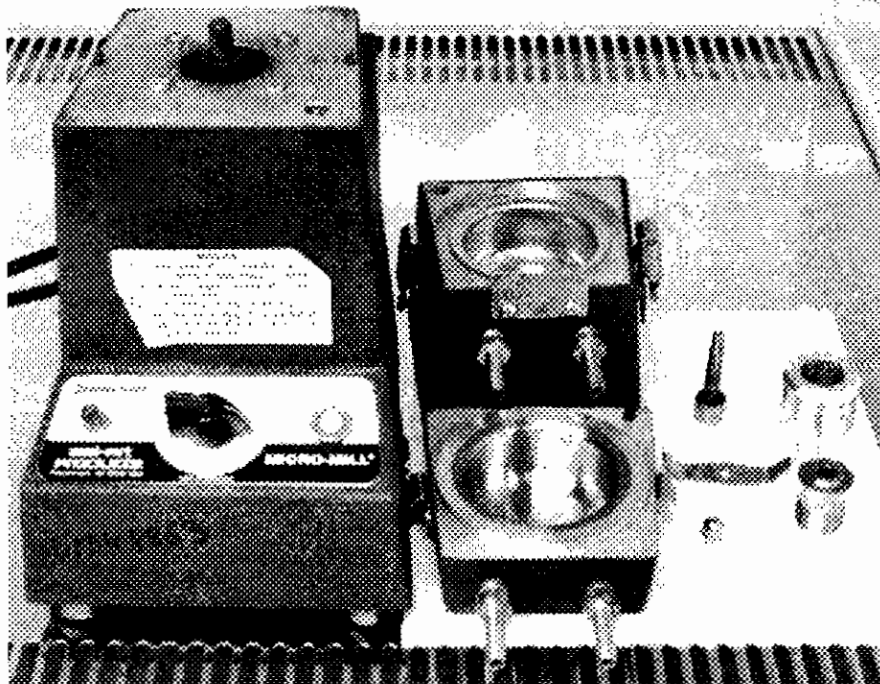


Рис. 4.2. Мельница для перемалывания костного материала

Метод выделения ДНК с использованием абсорбирующих веществ в последнее время получает все большее распространение в экспертной практике. Он может быть применен для выделения ДНК практически из любых объектов, содержащих ДНК. Данный метод не требует применения токсичных реактивов и может быть автоматизирован. В отличие от фенольного метода, при котором очистка экстракта происходит за счет удаления из него белковых примесей, в данном случае из экстракта удаляют (абсорбируют) саму ДНК, которую затем элюируют в специальном буфере (рис. 4.3).

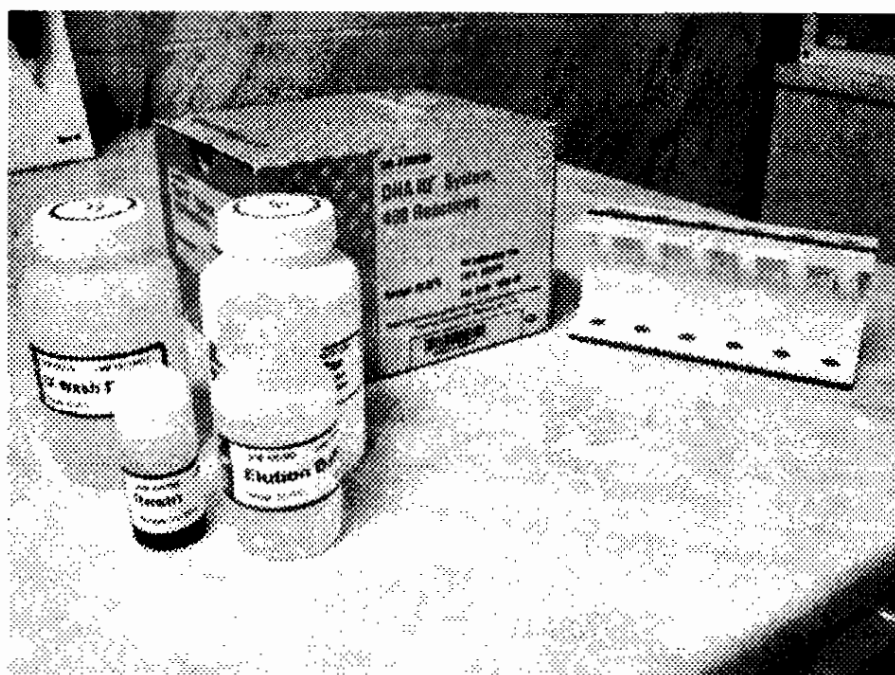


Рис. 4.3. Набор DNA IQ System

Применение данного метода для выделения ДНК из биологических объектов способствует более вероятному получению ДНК, свободной от ингибиторов ПЦР. В результате получают ДНК высокой степени очистки, которая пригодна для длительного хранения. Однако часть ДНК, содержащаяся в исследуемом объекте, на этапах абсорбции и элюции может теряться. К недостаткам метода следует отнести необходимость применения специального оборудования. Также этот метод является наиболее дорогостоящим. В настоящее время данный метод выделения ДНК особенно эффективен, когда имеется необходимость получения ДНК высокой степени очистки, не содержащей ингибиторы ПЦР. В дальнейшем,

при возрастании объемов исследования и возникновении необходимости автоматизации этого этапа исследования метод выделения ДНК с использованием абсорбирующих веществ может стать основным методом выделения ДНК.

4.2. Полимеразная цепная реакция

Метод ПЦР. Следующий этап исследования – проведение амплификации изучаемых полиморфных последовательностей ядерной ДНК методом полимеразной цепной реакции.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР или *PCR* от *Polymerase chain reaction*) представляет собой процесс контролируемого синтеза ДНК, позволяющий амплифицировать (копировать) интересные последовательности ДНК.



Кэри Б. Мюллис
(Kary B. Mullis)

Метод копирования ДНК посредством ПЦР был открыт в 1985 г. Кэри Мюллисом, сотрудником одной из биотехнологических компаний. За изобретение метода Кэри Мюллис в 1993 г. получил Нобелевскую премию по химии.

Процесс амплификации аналогичен процессу воспроизведения ДНК, который происходит в клетке перед ее делением, с тем лишь отличием, что копируется не вся хромосома, а лишь только ее короткий фрагмент.

ПЦР является циклическим процессом, осуществляемым при участии ДНК-полимеразы и обеспечивающим копирование уже имеющейся последовательности ДНК. В процессе реакции данная последовательность накапливается экспоненциально, и к концу реакции ее количество измеряется миллионами копий.

Границы копируемого участка ДНК определяются двумя праймерами – короткими синтетическими последовательностями однонитевой ДНК, комплементарными 3'-концам интересующей последовательности ДНК.

Фазы цикла амплификации. Цикл амплификации состоит из трех фаз: денатурации, отжига и достраивания, различающихся температурой (рис. 4.4).

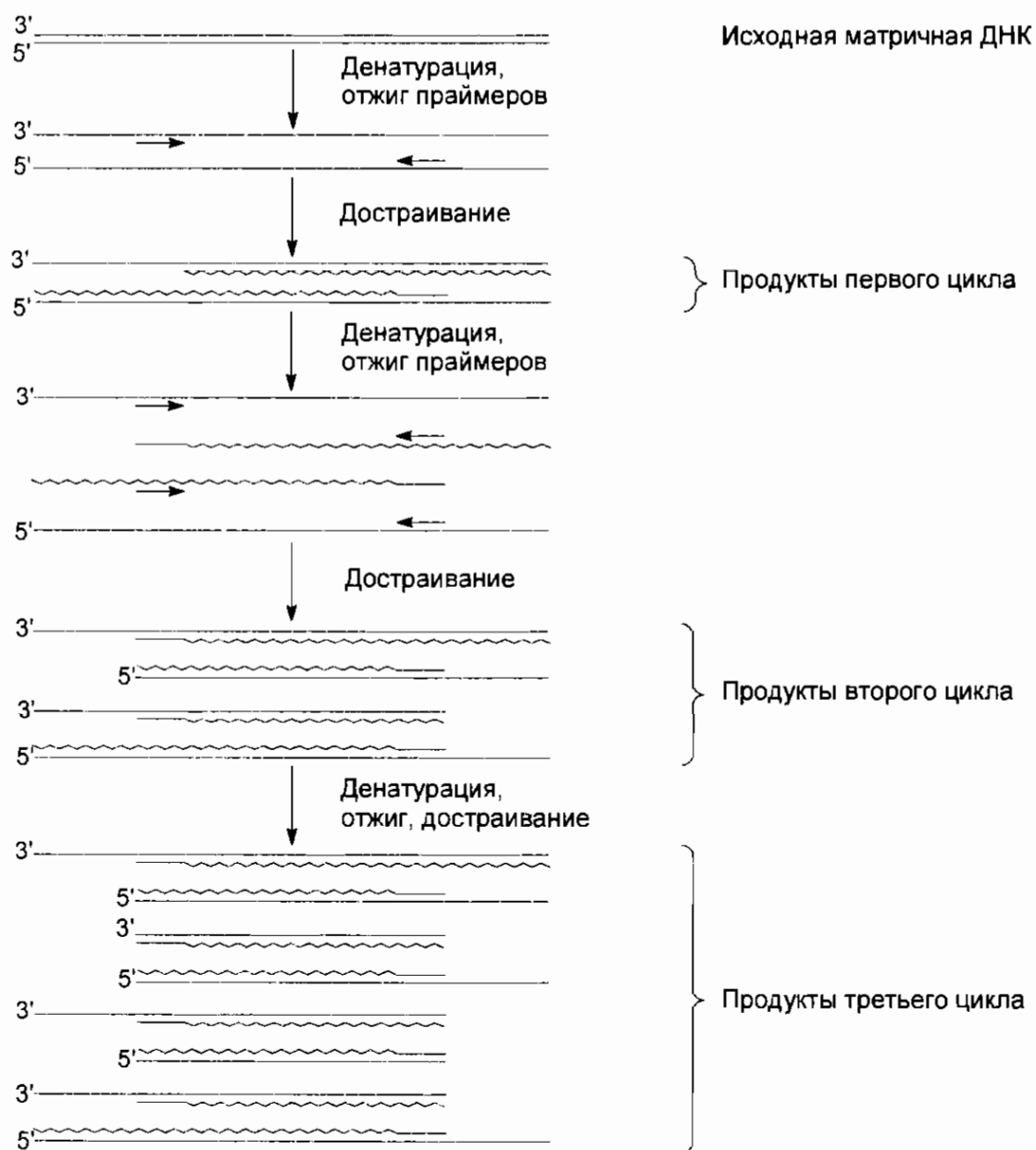


Рис. 4.4. Схема первых трех циклов ПЦР. После каждого цикла количество ДНК с заданной последовательностью удваивается

В первой фазе под действием высокой температуры (около 94–95 °С) происходит полная денатурация (разделение комплементарных цепей) матричной (исследуемой) ДНК с образованием одноцепочечных молекул.

Во второй фазе температура снижается и происходит отжиг праймеров на комплементарных им участках матричной ДНК.

Температура, которая требуется для отжига праймеров, зависит от состава оснований праймеров и обычно составляет 50–70 °С. Разработчики реагентов стремятся чтобы системы праймеров характеризовались относительно высокой температурой отжига. При более низкой температуре может происходить ренатурация исходной матричной ДНК и появление неспецифических продуктов реакции.

В период третьей фазы с участием ДНК-полимеразы происходит синтез или достраивание цепи, комплементарной матричной. Температура обычно варьируется в диапазоне 70–75 °С.

В результате при оптимальных условиях к концу цикла количество ДНК с заданной последовательностью удваивается.

В следующих циклах температурные фазы повторяются, при этом в качестве матричной ДНК служат не только исходные молекулы ДНК, но и те цепи, которые были синтезированы в предыдущих циклах. Теоретически, к концу 30-го цикла амплификации на основе одной молекулы ДНК синтезируется до 10^9 копий интересующей последовательности.

На первоначальных этапах применения метода ПЦР в качестве полимеразы использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. Coli*. Поскольку этот фермент разрушался при температуре денатурации ДНК, его необходимо было добавлять в каждом цикле на этапе достраивания цепи. Этот недостаток был преодолен после выделения из бактерии *Termus aquaticus*, обитающей в горячих источниках при температуре 70–75 °С, термостабильной ДНК-полимеразы (*Taq*-ДНК-полимеразы). Использование этой полимеразы при ПЦР позволило автоматизировать процесс амплификации, используя простой робот, называемый термоциклером или амплификатором.

Изобретение ПЦР и ее автоматизация повсеместно признано одним из самых основных прорывов в истории технологий исследования ДНК. Этот метод копирования ДНК оказался практически незаменимым в большинстве биотехнологических приложениях.

Широко применяют ПЦР и в судебно-генетической экспертизе. Именно ПЦР определяет высокую чувствительность криминалистического анализа ДНК.

Постановка ПЦР. При постановке ПЦР суммарную клеточную ДНК человека вводят в реакционную смесь, содержащую необходимые компоненты для работы термостабильной ДНК-полимеразы (*Taq*-ДНК-полимеразы). Матрицей для амплификации исследуемых участков STR-локусов ДНК служат молекулы ядерной ДНК исследуемого индивида. Специфическим компонентом реакции и амплификационной индивидуализирующей системы в целом являются олигонуклеотидные праймеры, определяющие, какой STR-локус будет избирательно синтезироваться в ходе реакции. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез новых полинуклеотидных цепей с помощью ДНК-полимеразы осуществляется только между ними, удваивая в каждом цикле количество копий этого участка ДНК

ДНК-амплификатор обеспечивает необходимый температурный профиль реакции, параметры которого – продолжительность и температура каждой стадии ПЦР зависят от структуры используемых праймеров и потому индивидуальны для каждой конкретной амплификационной индивидуализирующей системы (табл. 4.1).

Таблица 4.1

**Пример температурного профиля ПЦР,
используемого для синтеза STR-локусов**

Инициализирующая инкубация	Денатурация	Отжиг праймеров	Достраивание	Заключительное достраивание	Заключительная инкубация
	28 циклов				
95 °С	94 °С	59 °С	72 °С	60 °С	4 °С
11 мин	1 мин	1 мин	1 мин	60 мин	∞

При исследовании STR-локусов при ПЦР синтезируются фрагменты, длина которых зависит от числа повторяющихся единиц в конкретном локусе.

В случае исследования гомозиготного образца образуется один вид фрагментов, а в случае гетерозиготного – два. Общая длина синтезируемых фрагментов складывается из величины собственно

полиморфного участка, а также последовательностей, ограниченных праймерами и располагающихся по его флангам (рис. 4.5). Варьируя величиной этих последовательностей при подборе последовательностей праймеров, имеется возможность в итоге получать различные размеры продуктов ПЦР.



Рис. 4.5. Схема последовательностей ДНК, синтезируемых при типировании STR-локусов

Современные амплификационные системы. Одновременное использование нескольких амплификационных систем праймеров, различающихся размерами продуктов ПЦР обеспечивает возможность создания мультиплексных систем, позволяющих проводить исследование нескольких STR-локусов за один цикл исследования. Те же возможности обеспечивает использование различных флуоресцентных меток. В применяемых амплификационных системах праймеров один из праймеров несет флуоресцентную метку, которая в результате ПЦР встраивается в продукты реакции. Это позволяет осуществить в дальнейшем автоматизированную детекцию продуктов ПЦР. При одновременном использовании нескольких амплификационных систем праймеров, различающихся флуоресцентными метками появляется возможность различать продукты ПЦР разных локусов независимо от их величины.

В современных наборах для типирования STR-локусов ДНК человека применяют оба варианта создания мультиплексных систем, что позволяет типировать в рамках одного цикла исследования порядка 16 STR-локусов и более.

Следует отметить, что температурный профиль ПЦР зависит от структуры используемых праймеров и индивидуален для каждой конкретной системы праймеров. Для создания и оптимизации

мультиплексных систем анализа ДНК необходим тщательный подбор систем праймеров со сходными условиями ПЦР. Очевидно, что подобные задачи невозможно решить без соответствующего компьютерного моделирования.

Применение мультиплексных систем определяет высокие требования к специфичности процесса ПЦР. Неконтролируемый синтез ДНК, который может происходить при подготовке ПЦР, приводит к возникновению неспецифических продуктов реакции, затрудняющих дальнейшую интерпретацию результатов.

В современных амплификационных системах реализован так называемый «горячий старт», который достигается использованием инактивированной термостабильной ДНК-полимеразы. Данная полимеразы лишена полимеразной активности и при подготовке ПЦР неконтролируемого синтеза ДНК не происходит. При проведении ПЦР в режим амплификации вводят дополнительную инкубацию при 95 °С для разрушения комплекса антиген-антитело и восстановления у полимеразы ее полимеразной активности. Последующие этапы ПЦР проводят при высоких температурах, что обеспечивает ее специфичность.

Другой особенностью проведения ПЦР мультиплексных систем, повышающей специфичность процесса, является введение в режим амплификации заключительной инкубации при 60°С. В процессе синтеза ДНК при завершении матричной цепи для ДНК-полимеразы характерно встраивание одного «лишнего» нуклеотида. Эффективность такого встраивания зависит от ряда факторов, что в итоге приводит к присутствию среди продуктов ПЦР фрагментов как с «лишним» нуклеотидом (N+1-фрагменты), так и без него (N-фрагменты). В результате заключительной инкубации при 60 °С происходит достройка к синтезированным продуктам ПЦР одного дополнительного нуклеотида и устранение неспецифических N-фрагментов.

Новым вариантом исследования STR-локусов является применение амплификационных систем типа «мини STR». В таких системах укорочены последовательности, располагающиеся по флангам полиморфного участка. В результате общая величина продуктов ПЦР уменьшена так, что не превышает 200 п.н. Применение

таких систем способствует более вероятному получению результата при исследовании проб, содержащих деградированную ДНК.

Однако у амплификационных систем типа «мини STR» имеются недостатки, которые не позволяют их применять для массовых исследований. При уменьшении последовательностей, располагающихся по флангам полиморфного участка, изменяется и область прикрепления праймеров, которая оказывается вне кодирующих участков ДНК. В этих местах вероятность мутационных точковых замен, инсерций и делеций выше, чем в кодирующих участках ДНК.

В результате на исследуемой матричной ДНК может не оказаться последовательности, полностью комплементарной последовательности праймерам, что приведет к сбою ПЦР, или величина синтезируемой последовательности окажется иной по сравнению с обычными амплификационными системами. В итоге повышается вероятность ложного заключения о гомозиготности образца ДНК, на самом деле являющегося гетерозиготным, имеющего во втором аллеле мутационные замены в области прикрепления праймеров, или установления неверного генотипа. Вероятность таких мутаций может достигать 0,005, что соответствует ложному генотипированию (при исследовании одного локуса) в одном из 200 случаев.

4.3. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Принцип метода. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (RT-PCR) является развитием метода полимеразной цепной реакции. Благодаря применению современного оборудования и реагентов имеется возможность фиксации выхода (накопления) продукта реакции после каждого цикла амплификации. Это позволяет строить кинетические кривые ПЦР (рис. 4.6).

Практическое применение RT-PCR позволяет как модернизировать применяемые схемы исследования ДНК, так и решать ряд самостоятельных задач. Реализуется метод RT-PCR с помощью специального термоциклера, дополненного системой детекции флуоресцентных сигналов (рис. 4.7).

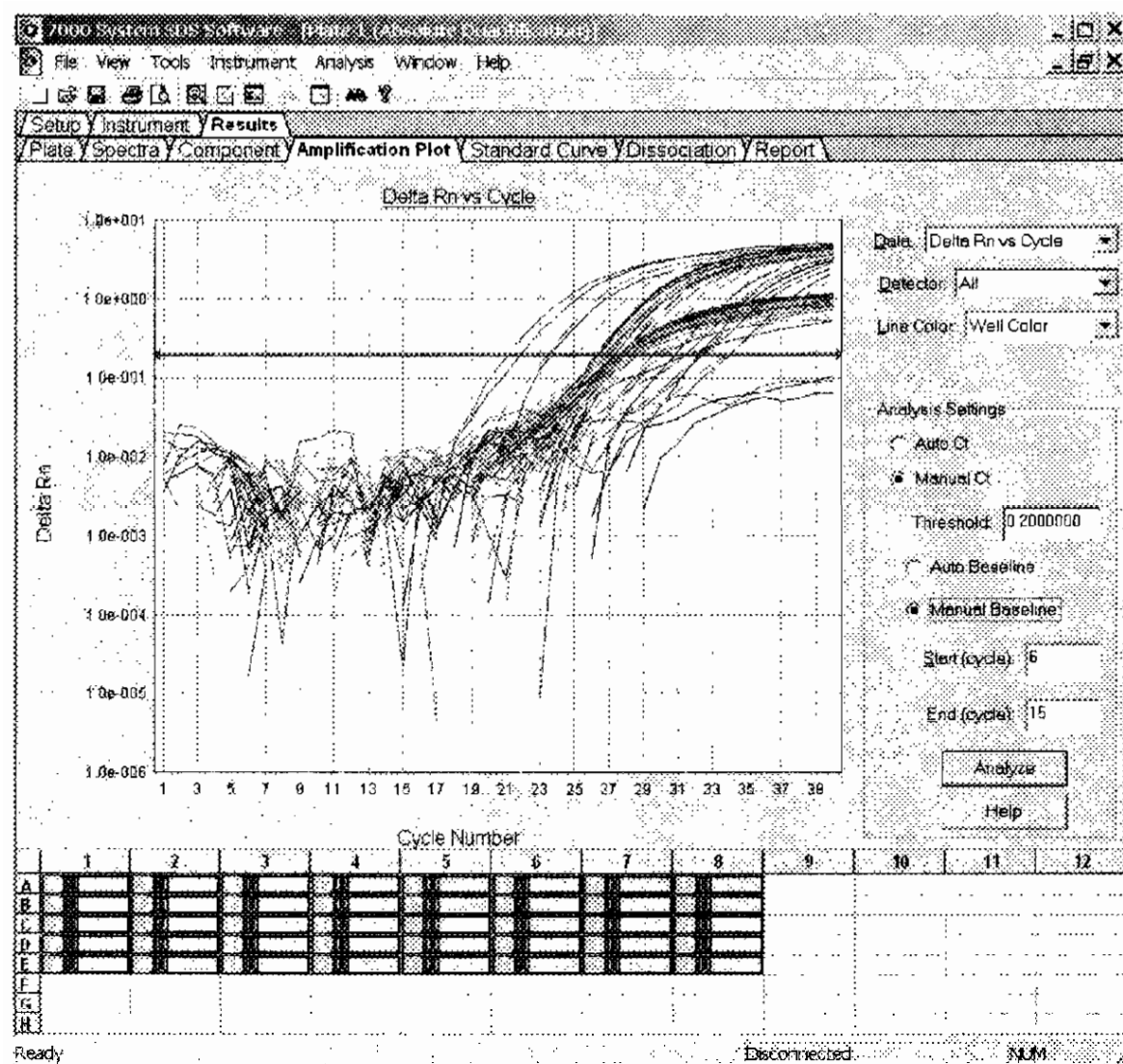


Рис. 4.6. Кинетические кривые ПЦР

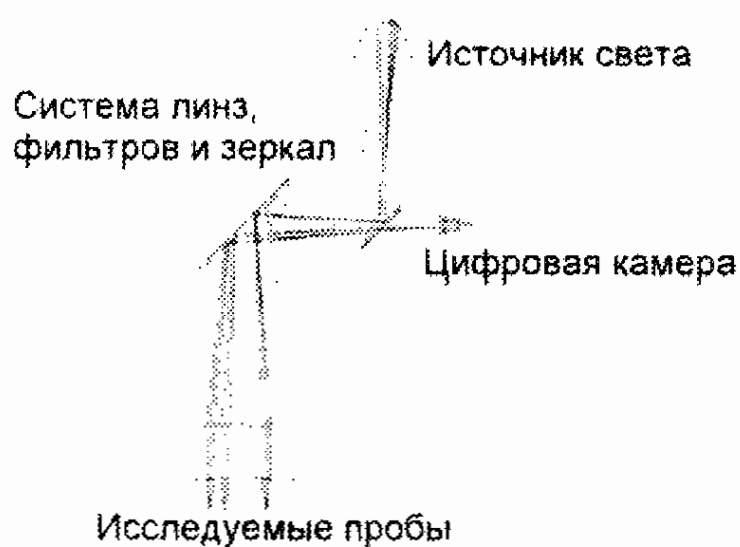


Рис. 4.7. Схема детекции флуоресцентных сигналов при RT-PCR

При каждом цикле ПЦР свет через оптическую систему возбуждает свечение флуоресцентных красителей, содержащихся в исследуемых пробах. Источником света в зависимости от используемого оборудования могут являться галогеновые лампы, лазеры. Возбужденное свечение фиксируется цифровой камерой и сохраняется на компьютере. Процесс считывания интенсивности флуоресценции производится после каждого цикла ПЦР для каждой исследуемой пробы ДНК.

Существуют различные варианты проведения ПЦР с флуоресцентными реагентами, позволяющими детектировать накопление продуктов ПЦР.

Наиболее современным методом, обладающим наивысшей чувствительностью и точностью является применение специальных зондов TaqMan. В этом случае после первой фазы ПЦР – денатурации и во время второй фазы – отжига праймеров – к матричной цепи ДНК также присоединяется зонд TaqMan – искусственно созданный олигонуклеотид, который представляет собой короткий фрагмент ДНК, комплементарный участку, синтезируемому при ПЦР (рис. 4.8). Зонд TaqMan содержит две флуоресцентные метки – репортерный краситель в 5'-конце (reporter) и гаситель флуоресценции в 3'-конце (quantcher). Эти метки подобраны так, что, когда они рядом – флуоресценция гасится друг другом. Это означает, что при инициации реакции отсутствует флуоресценция исследуемых проб. Начальные измерения детектором соответствуют фоновому сигналу.

При следующей фазе ПЦР – достраивании – роль ДНК-полимеразы оказывается двоякой. Данный фермент удлиняет цепь ДНК, последовательно присоединяя по одному нуклеотиду к 3'-концу, осуществляя синтез в направлении 5'–3', и, в то же время, осуществляется его экзонуклеазная активность, в процессе которой разрушается зонд TaqMan. Метки зонда освобождаются, выходят в раствор и восстанавливают способность флуоресцировать. Накопление продуктов ПЦР регистрируется по увеличению флуоресценции репортерного красителя. Увеличение флуоресцентного сигнала происходит только в случае специфичной амплификации определенного участка человеческой ДНК. При этом исключается воз-

возможность детектирования продуктов неспецифической амплификации и бактериальной ДНК.

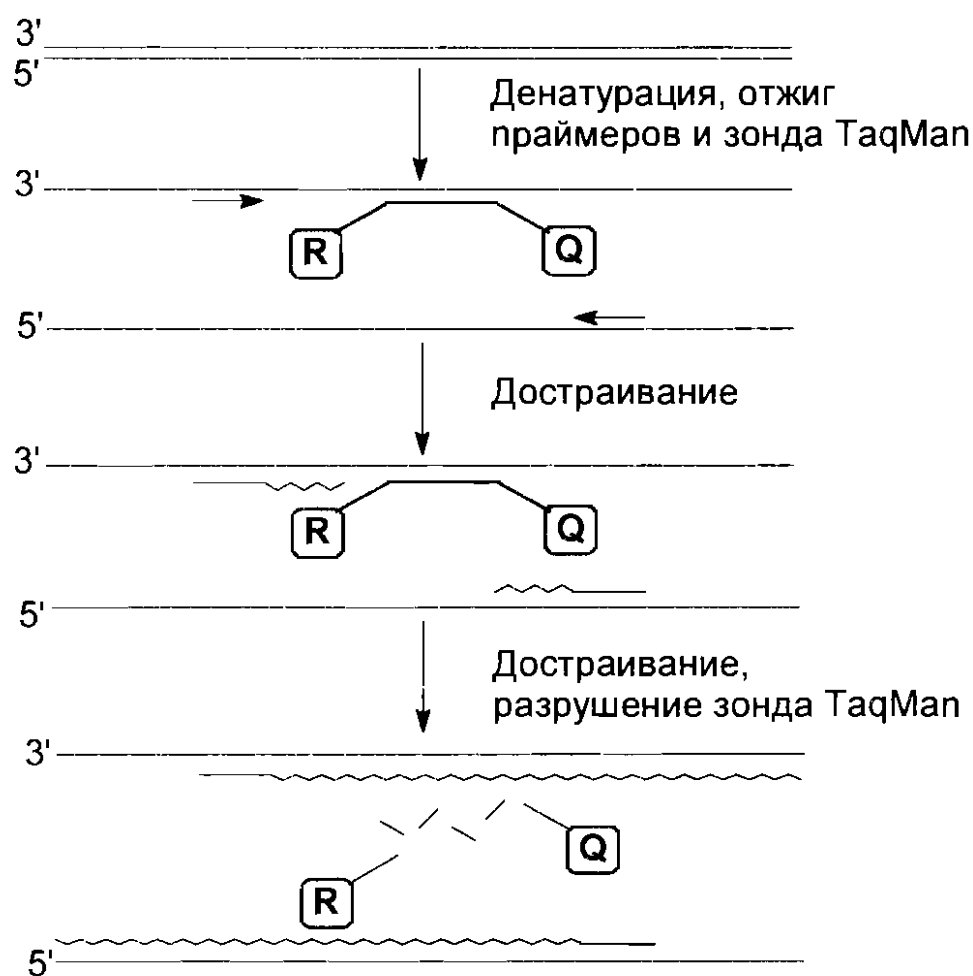


Рис. 4.8. Схема RT-PCR с использованием зонда TaqMan

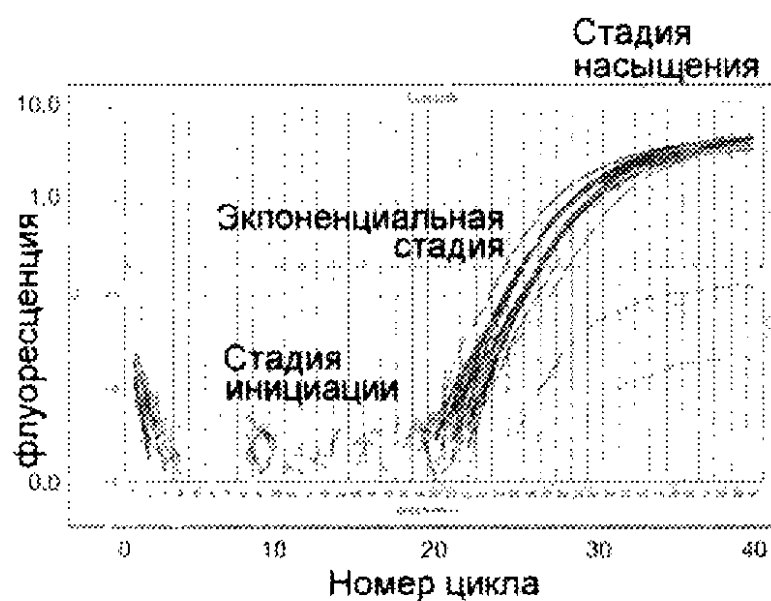


Рис. 4.9. Стадии ПЦР

Кинетическую кривую ПЦР получают при построении кривой зависимости возрастания флуоресцентного сигнала от числа циклов ПЦР. Кривая имеет сигмовидную форму. В ней выделяют три области или стадии (рис. 4.9): стадию инициации, когда ПЦР – продукты еще не детектируются, экспоненциальную стадию, когда наблюдается экспоненциальная зависимость количества флуоресценции от цикла ПЦР и стадию насыщения в виде плато.

Использование метода в судебно-генетических исследованиях. В судебно-генетической практике RT-PCR применяют для решения задач по установлению концентрации ДНК человека в исследуемых пробах, установлению ингибиторов ПЦР, а также установления половой принадлежности.

Данные о концентрации ДНК в пробах после ее выделения из исследуемых объектов необходимы для успешного проведения последующих этапов исследования ДНК.

В случае ее недостаточного количества необходимо остановить исследование и повторить этап выделения ДНК. Это позволит сэкономить как время, так и дорогостоящие реагенты, которые могли быть напрасно истрачены. С другой стороны, в случае избыточного выделения ДНК результаты количественной оценки проб ДНК позволят разбавить их до оптимальной концентрации и этим устранить ряд неспецифических явлений, возникающих при исследовании избыточных количеств ДНК. Таким образом, полимеразную цепную реакцию в реальном времени технологически проводят до этапа основной ПЦР.

В результате проведения RT-PCR на первых циклах (от шестого до пятнадцатого) чувствительности детекционного оборудования недостаточно для учета флуоресценции – наблюдаемое свечение называют *базовой линией* (Baseline). Линия, которая выше базовой линии на 0,2 условных единиц интенсивности флуоресценции, называется *пороговой линией* (Threshold). Цикл, в котором флуоресцентный сигнал возрастает и происходит пересечение пороговой линии, называется пороговым циклом (Ct). На его значение влияют как исходная концентрация человеческой ДНК, так и степень эффективности ПЦР.

В ходе исследования определяют пороговые циклы анализируемых проб. Те образцы, в которых концентрация человеческой ДНК больше, быстрее достигают пороговой линии при более низких номерах циклов, чем образцы с меньшей концентрацией.

Для вычисления абсолютной концентрации ДНК исследуемых проб используют калибровочные пробы, для которых концентрация ДНК известна. На основе результатов определения пороговых циклов калибровочных проб строится калибровочный график (Standard Curve) зависимости порогового цикла (Ct) от исходной концентрации ДНК (рис. 4.10). По такому графику можно определить по измеренному значению Ct концентрацию ДНК в неизвестных пробах. При использовании современного оборудования данный учет и определение осуществляется автоматизировано.

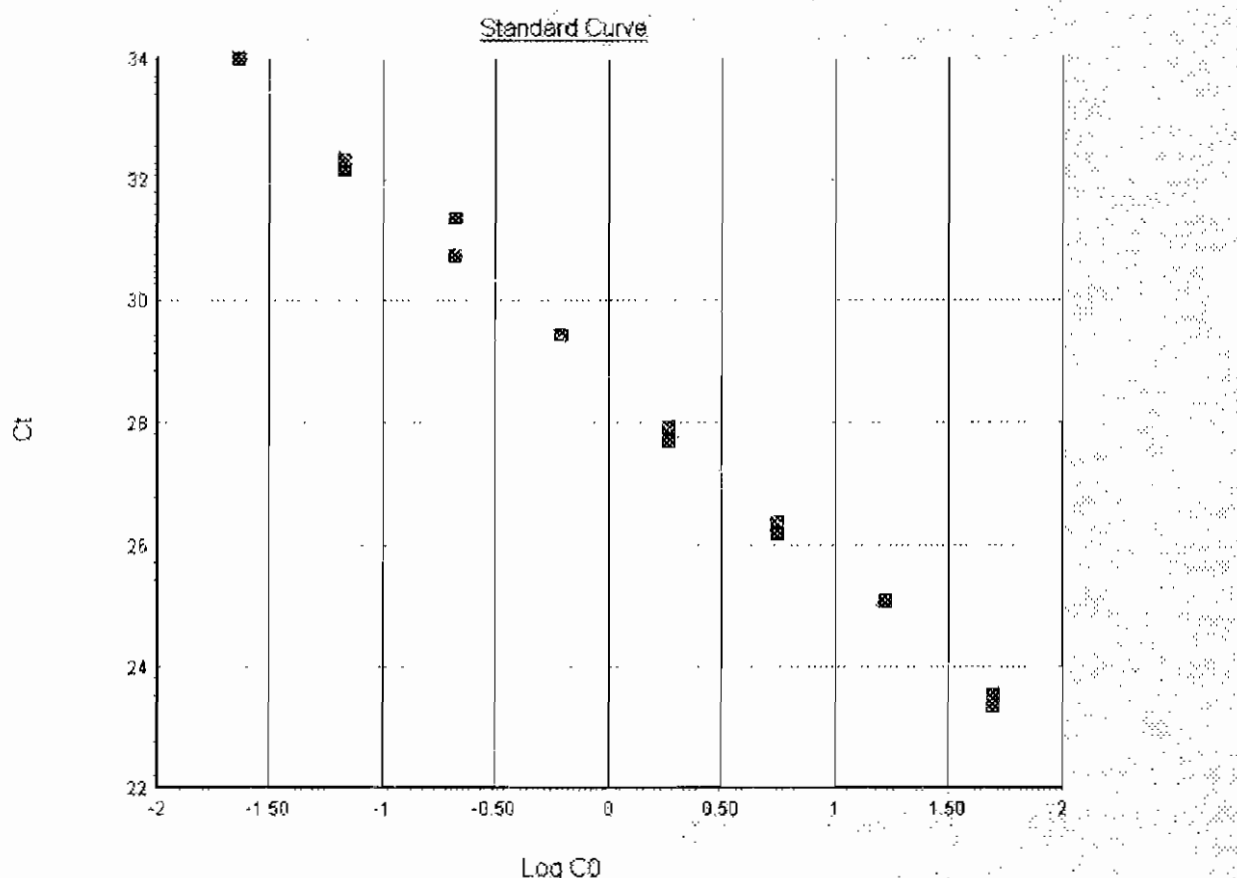


Рис. 4.10. Калибровочный график для определения концентрации ДНК

Для реализации возможности установления ингибиторов ПЦР в исследуемых пробах параллельно с ПЦР на матрице человеческой ДНК также происходит ПЦР на матрице синтетической последова-

тельности ДНК, которая не встречается в природе. Для осуществления этой ПЦР в реакционной среде присутствуют два праймера (прямой и обратный) и свой зонд TaqMan, имеющий уже другую флуоресцентную метку – для обнаружения именно этой синтетической последовательности. Такая вторая ПЦР называется внутренним контролем ПЦР (IPC).

По результатам оценки реакции IPC можно контролировать ПЦР: не были ли допущены ошибки при постановке ПЦР или есть ли в среде ингибиторы ПЦР. Возможны следующие варианты контроля:

1) есть сигнал IPC и сигнал исследуемой ДНК – это норма, ошибок при исполнении не было;

2) есть сигнал IPC, нет сигнала исследуемой ДНК – количества исследуемой ДНК недостаточно для ПЦР. Необходимо повторить выделение ДНК или объект непригоден для исследования;

3) нет сигнала IPC или он слабее, чем в других пробах, нет сигнала исследуемой ДНК – частичное или полное ингибирование ПЦР. Необходимо повторить выделение ДНК или объект непригоден для исследования;

4) нет сигнала IPC или он слабее, чем в других пробах, есть сигнал исследуемой ДНК – наблюдается преимущественная амплификация исследуемой ДНК, вероятнее всего, за счет ее большого количества (сигнал IPC в данном случае игнорируется).

Половая принадлежность исследуемого объекта устанавливается за счет применения дополнительной пол-специфичной системы ПЦР и соответствующего зонда TaqMan, комплементарных последовательностям Y-хромосомы. Исследование проводят параллельно с исследованием по установлению концентрации ДНК человека. Возможны следующие варианты результатов исследования:

1) сигналы исследуемой ДНК и ДНК Y-хромосомы одинаковы – это означает, что установлен мужской генетический пол;

2) есть исследуемой ДНК, нет сигнала ДНК Y-хромосомы – установлен женский генетический пол;

3) сигналы исследуемой ДНК и ДНК Y-хромосомы не одинаковы – это означает, что в пробе присутствует смесь ДНК лиц женского и мужского генетического пола.

4.4. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР

Сущность метода электрофореза. В настоящее время фракционирование и детекция флуоресцентно меченых продуктов ПЦР проводятся в автоматизированных системах (секвенаторах или генетических анализаторах). В этих системах автоматизированы этапы электрофореза, детекции флуоресцентно меченых фрагментов ДНК и учета результатов электрофореза (рис. 4.11).

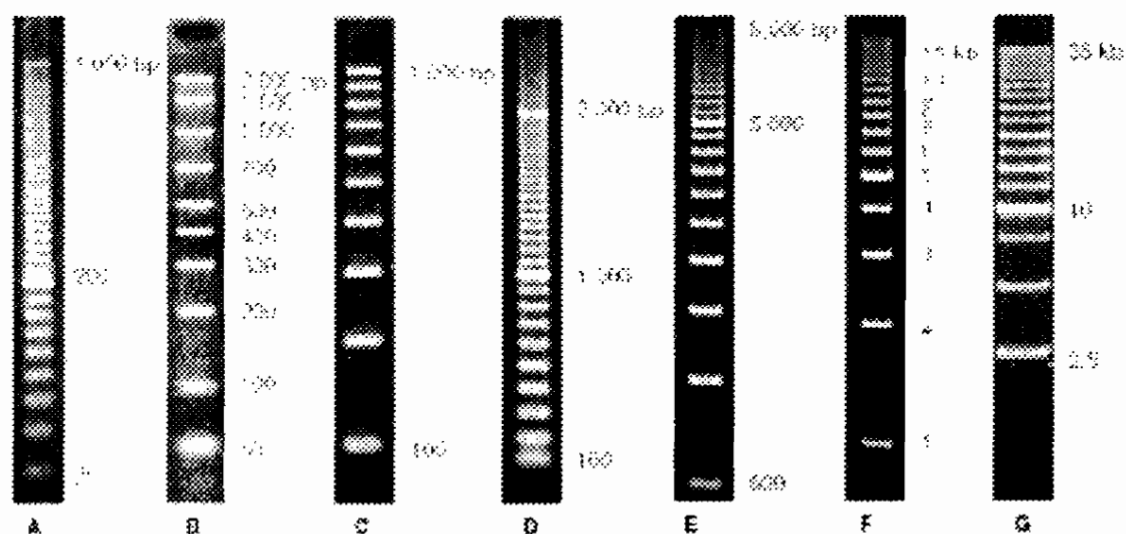


Рис. 4.11. Электрофорез различных фрагментов ДНК

Используя метод электрофореза, фрагменты ДНК различной длины могут быть фракционированы. Этот метод является важнейшим методом исследования ДНК и широко используется в криминалистическом ДНК-анализе.

Средой для электрофореза служит среда на основе полиакриламида, формирующая сетчатую структуру с величиной ячеек, соизмеримой с величиной молекулы ДНК. Исследуемые пробы ДНК вносят в среду для электрофореза и накладывают электрическое поле. Фрагменты ДНК (имеющие отрицательный заряд) начинают перемещаться к аноду (положительно заряженному электроду), испытывая сопротивление сетчатой среды геля. Чем короче фрагмент, тем меньшее сопротивление он испытывает и тем быстрее он движется (скорость миграции обратно пропорциональна логарифму

длины фрагмента). В результате электрофореза в среде образуются участки, содержащие фрагменты ДНК. Те области, которые располагаются ближе к аноду, соответствуют меньшим по длине фрагментам, а те, которые дальше, – большим (см. рис. 4.11).

В автоматизированных приборах электрофорез проводят до тех пор, пока все фрагменты ДНК не пересекут область детекции, которая располагается со стороны анода (рис. 4.12). В этой области среда электрофореза освещается лазером, который возбуждает свечение флуоресцентных меток продуктов ПЦР. Цифровая камера фиксирует свечение меток, которое сохраняется на компьютере.

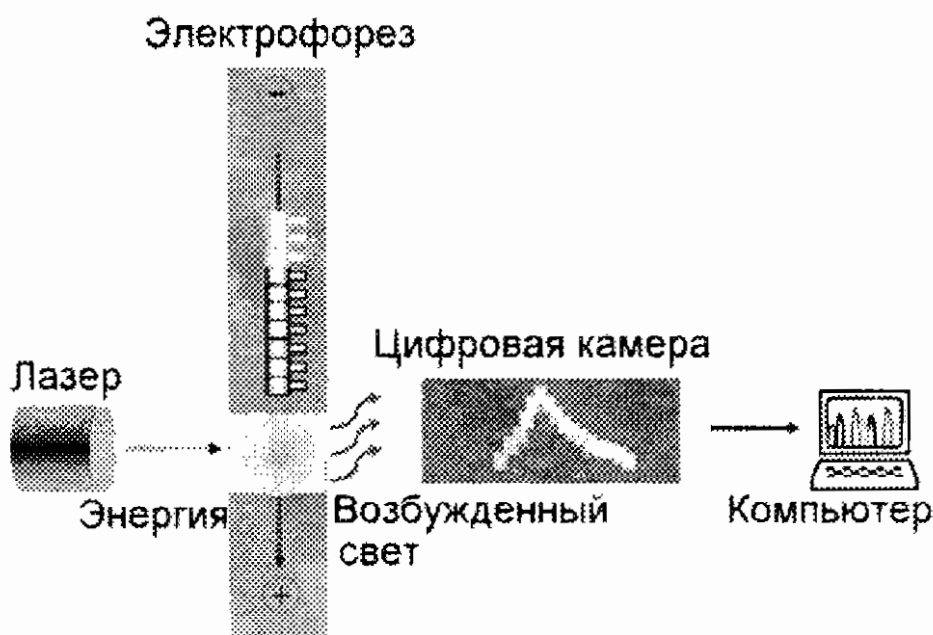


Рис. 4.12. Схема электрофореза ДНК с автоматизированной детекцией флуоресцентных меченных продуктов ПЦР

В результате фракционирования продуктов ПЦР STR-локусов ДНК на приборах получают первичные графические данные электрофореграмм. Эти данные представляют собой график измерений детектором интенсивности свечения флуоресцентных меток (рис. 4.13).

Для определения длины исследуемых фрагментов ДНК перед электрофорезом каждую исследуемую пробу смешивают с денатурирующим реагентом формамидом и специальным маркером – внутренним стандартом, содержащим смесь фрагментов известной длины (рис. 4.14).

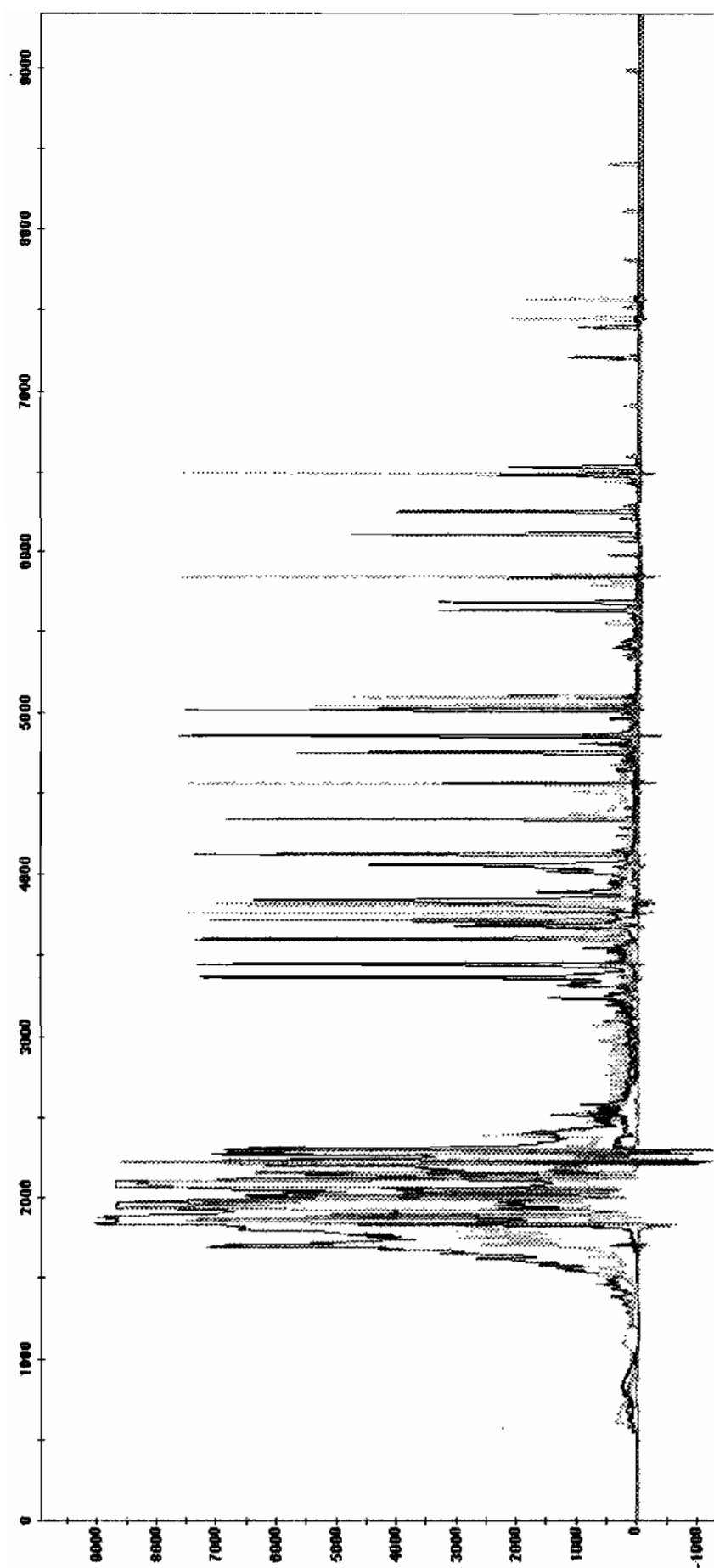


Рис. 4.13. Первичные данные электрофореза продуктов ПЦР STR-локусов ДНК

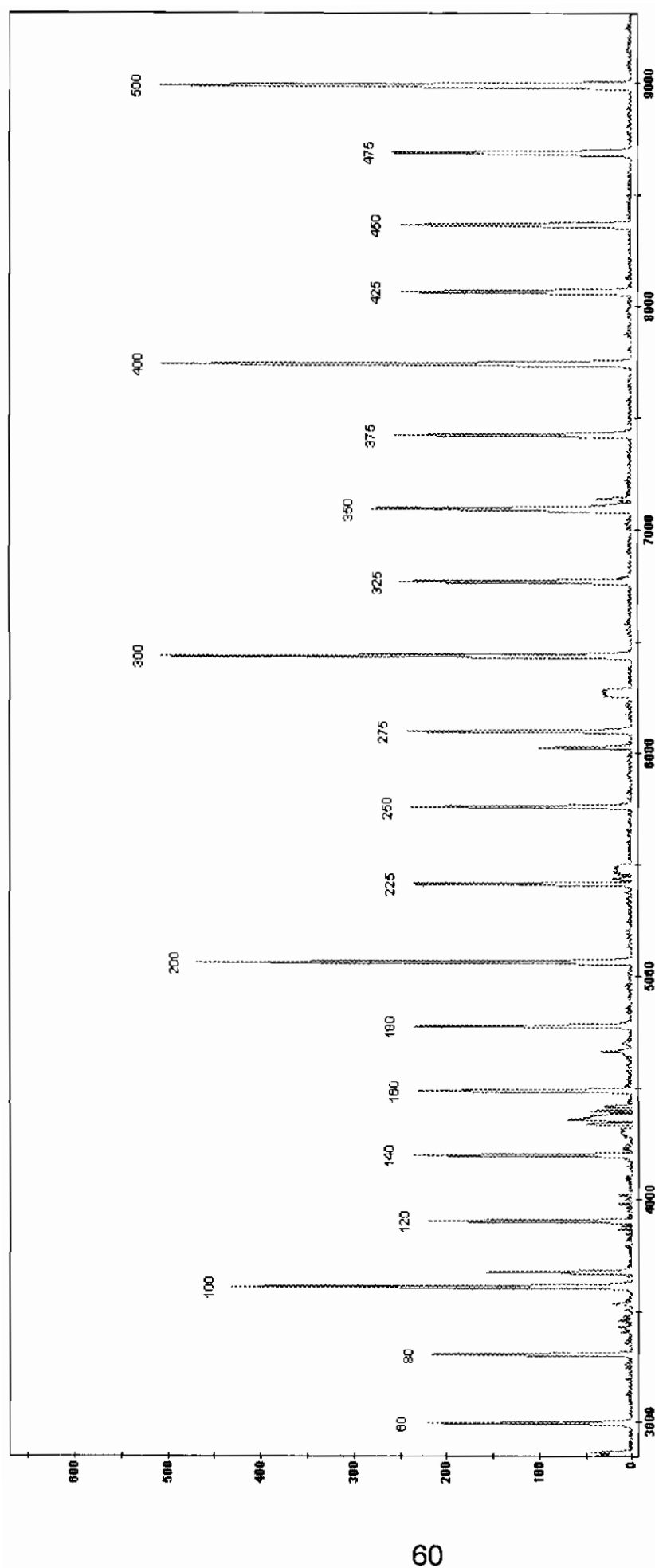


Рис. 4.14. Электрофорез фрагментов внутреннего стандарта

Фрагменты внутреннего стандарта содержат флуоресцентную метку, отличающуюся от флуоресцентных меток продуктов ПЦР. После электрофореза по расположению исследуемых фрагментов относительно фрагментов внутреннего стандарта, используя специальный компьютерный анализ, имеется возможность с высокой точностью установить величины исследуемых фрагментов ДНК.

Виды автоматизированных систем для электрофореза ДНК. В настоящее время существует два основных варианта автоматизированных систем:

1) для электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле;

2) для электрофореза в капилляре в среде специального полимера при денатурирующих условиях (капиллярный электрофорез).

Примером прибора, позволяющего проводить фракционирование и детекцию флуоресцентно меченых продуктов секвенирующих реакций по первому варианту является секвенатор ABI Prism 377 DNA Sequencer, производства фирмы Applied Biosystems, США. Примером приборов, работающих по второму варианту – ABI Prism 310 Genetic Analyzer, 3100 и 3130 Genetic Analyzer, производства фирмы Applied Biosystems, США (рис. 4.15).

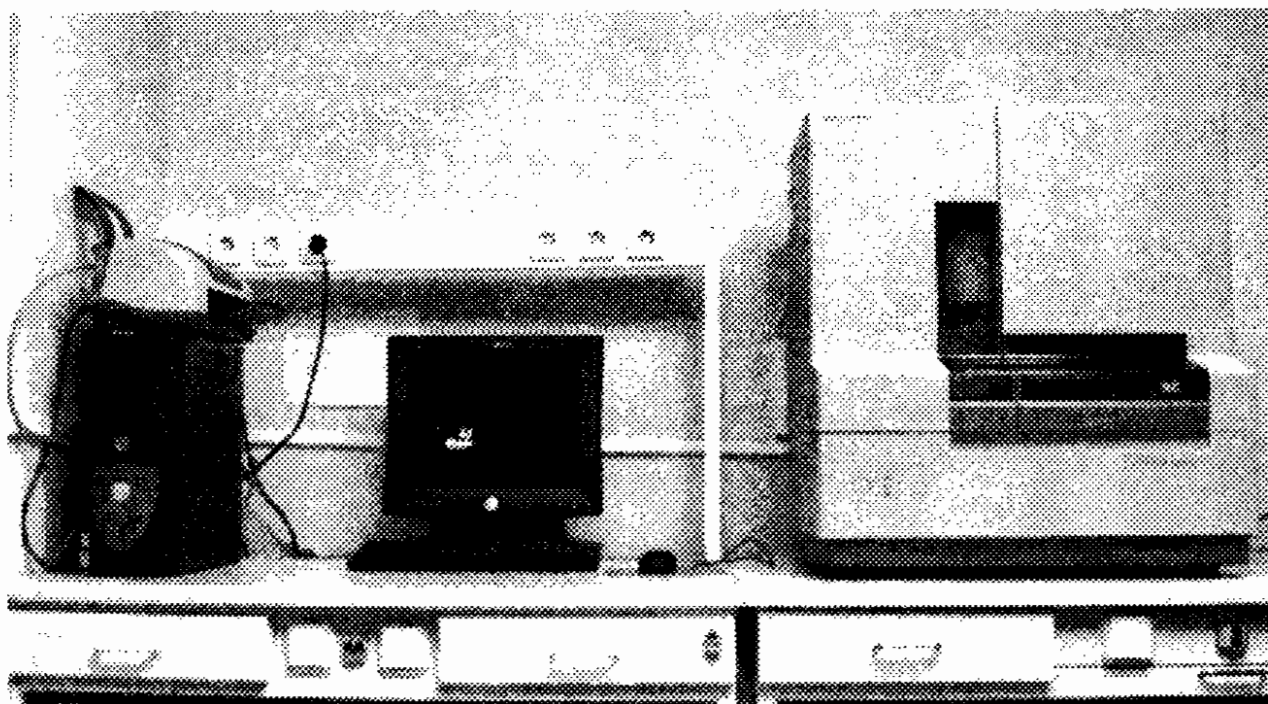


Рис. 4.15. Генетический анализатор ABI Prism 3130 Genetic Analyzer

Достоинством первого варианта электрофореза являются меньшие требования, предъявляемые к чистоте и качеству реактивов, меньшая стоимость анализа, проведение традиционных для ручного исследования процедур (приготовление полиакриламидного геля, подготовка образцов, их нанесение и т.д.). Недостатком этого варианта является необходимость проведения значительного количества ручных операций, цикличность работы, требующая накопления объектов исследования.

Приборы капиллярного электрофореза лишены вышеприведенных недостатков, однако для них характерна более высокая стоимость анализа. Важным достоинством этих приборов является значительно более высокая скорость проведения электрофореза, что позволяет оперативно проводить анализ исследуемых объектов. Кроме этого, приборы капиллярного электрофореза могут быть встроены в единую автоматизированную линию исследования ДНК.

В настоящее время в отличие от традиционных систем электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле происходит активное развитие систем капиллярного электрофореза. Их следует рассматривать как основные приборы для криминалистических лабораторий ДНК-анализа.

Расшифровку первичных электрофореграмм проводят с помощью компьютерной программы GeneMapper ID, производства фирмы Applied Biosystems.

Интерпретация результатов электрофореза с помощью программы GeneMapper ID. Интерпретация результатов электрофореза с помощью программы GeneMapper ID заключается в установлении аллелей исследуемых STR-локусов.

Для установления аллелей при электрофорезе продуктов ПЦР исследуемых проб используют также пробу специального аллельного маркера или *лэддера*. Эта проба содержит фрагменты ДНК, соответствующие по последовательности и размерам всем встречающимся аллелям исследуемых локусов (рис. 4.16). Аллельный лэддер является внешним стандартом исследования. Аллельные лэддеры производятся изготовителями реактивов для амплификации.

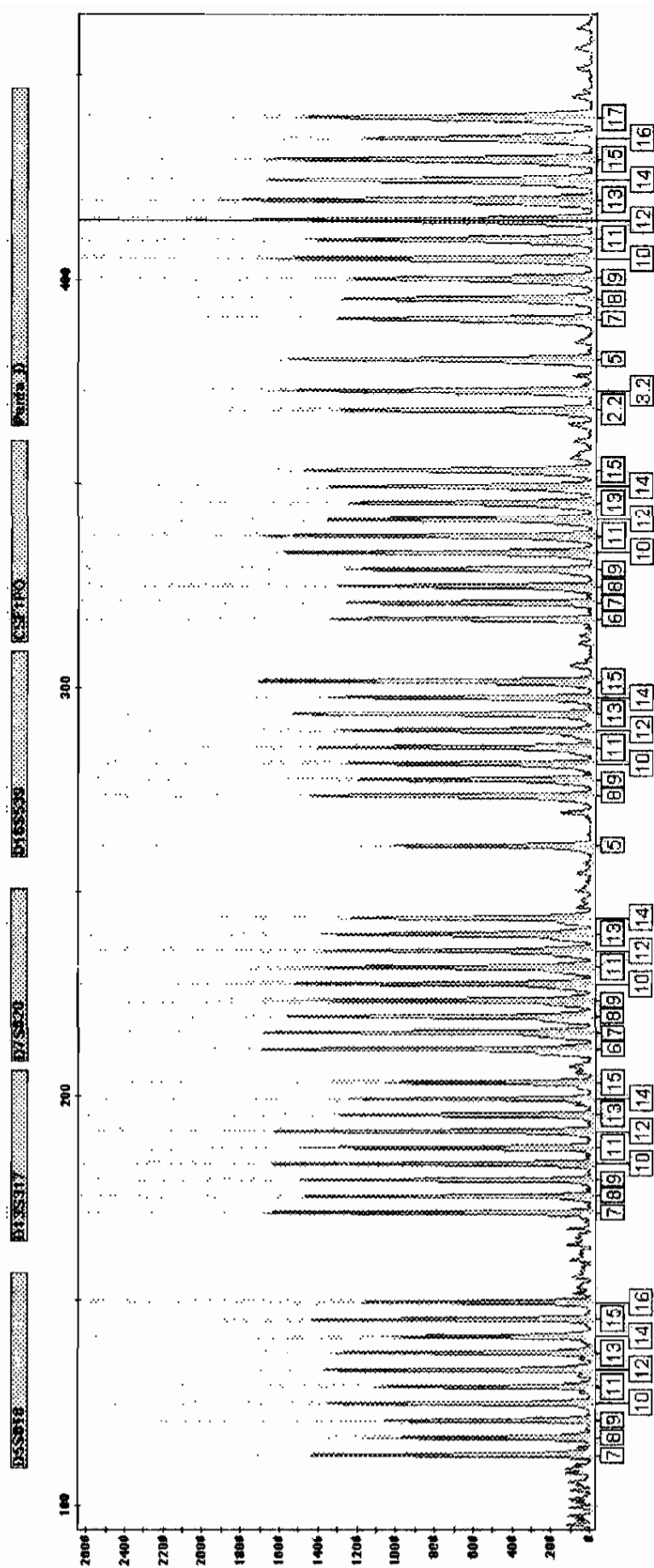


Рис. 4.16. Электрофорез фрагментов аллельного маркера

С помощью компьютерной программы GeneMapper ID общая электрофореграмма пробы разделяется на электрофореграммы по отдельным флуоресцентным красителям. Сначала величина исследуемых фрагментов определяется по их расположению относительно фрагментов внутреннего стандарта. Далее полученные величины сравниваются с величинами фрагментов аллельного лэддера. Допустимое отклонение исследуемых фрагментов от фрагментов аллельного лэддера не должно превышать $\pm 0,5$ нуклеотида. При наличии совпадений фрагмент обозначается в соответствии с принятой номенклатурой аллелей, при отсутствии – обозначается как неопределенный.

Все фрагменты, обозначенные как неопределенные или локализующиеся выше и ниже крайних аллелей лэддера, должны быть проанализированы. При необходимости электрофорез повторяют.

При воспроизводимости результатов фрагменты, не совпадающие с фрагментами аллельного лэддера обозначают вручную в соответствии с принятой номенклатурой аллелей. В случае отсутствия воспроизводимости выявленные первоначально фрагменты являются неспецифическими и дальнейшему анализу не подлежат.

При анализе электрофореграмм могут быть обнаружены и другие неспецифические фрагменты, которые необходимо отличать от истинных аллелей. Часто выявляют так называемые *статтеры* (рис. 4.17) – фрагменты, которые короче истинного аллеля на одну повторяющуюся единицу (т.е. по уровню расположения соответствуют фрагменту лэддера, предшествующему истинному аллелю).

Для статтера характерны два признака, по которым его отличают от истинных аллелей, а также отличают гомозиготный профиль со статтером от гетерозиготного профиля:

- 1) если появляется статтер, то он всегда ассоциирован с истинным аллелем (он короче истинного аллеля на одну повторяющуюся единицу);

- 2) интенсивность статтера обычно не превышает 15 % интенсивности истинного аллеля, с которым он ассоциирован.

Другими, часто выявляемыми неспецифическими фрагментами являются так называемые *N-фрагменты* (рис. 4.18). Их появление связано с тем, что ДНК-полимераза обладает свойством достраивать во вновь синтезированную цепь ДНК один лишний нуклеотид.

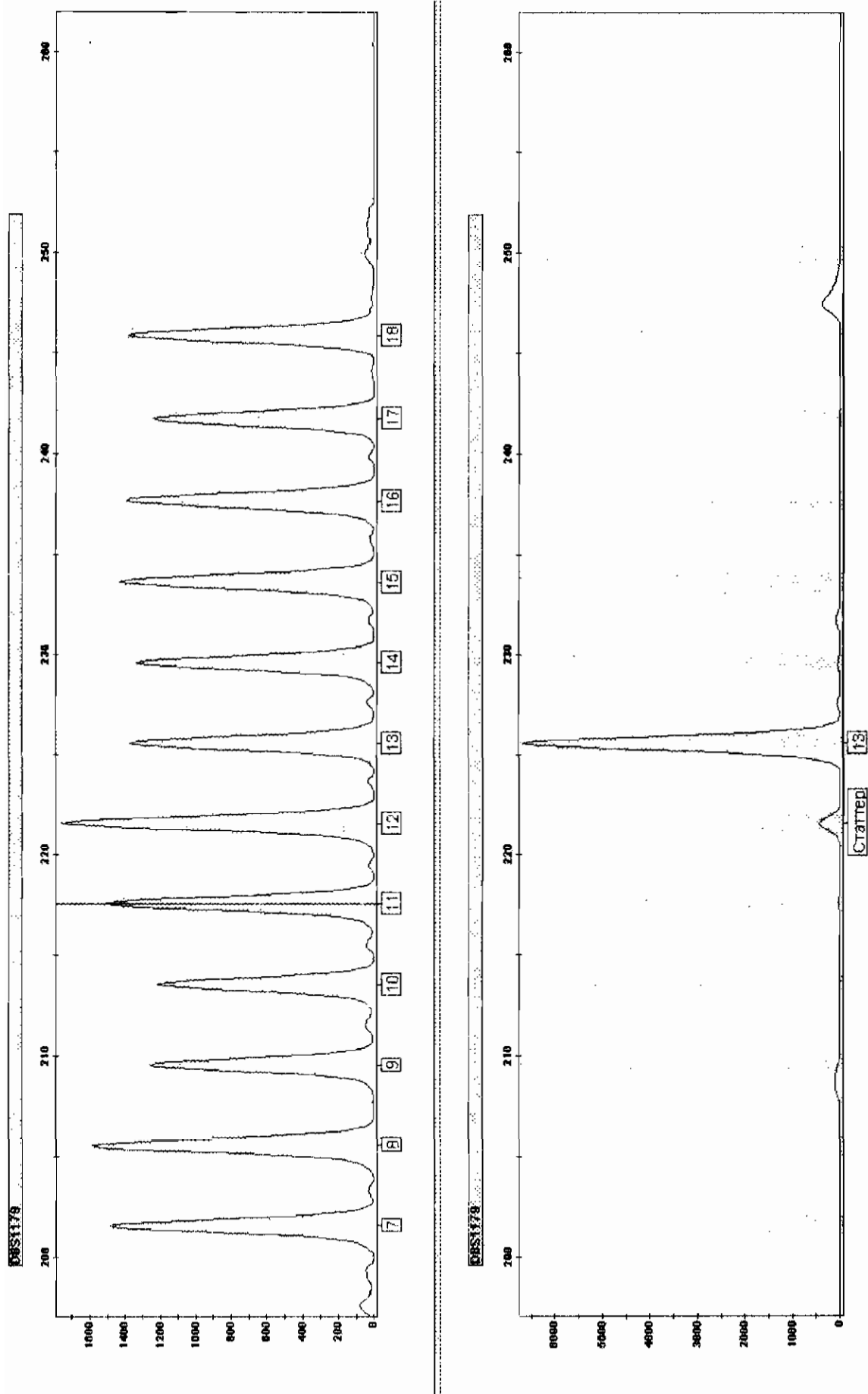


Рис. 4.17. Неспецифические явления – статтер

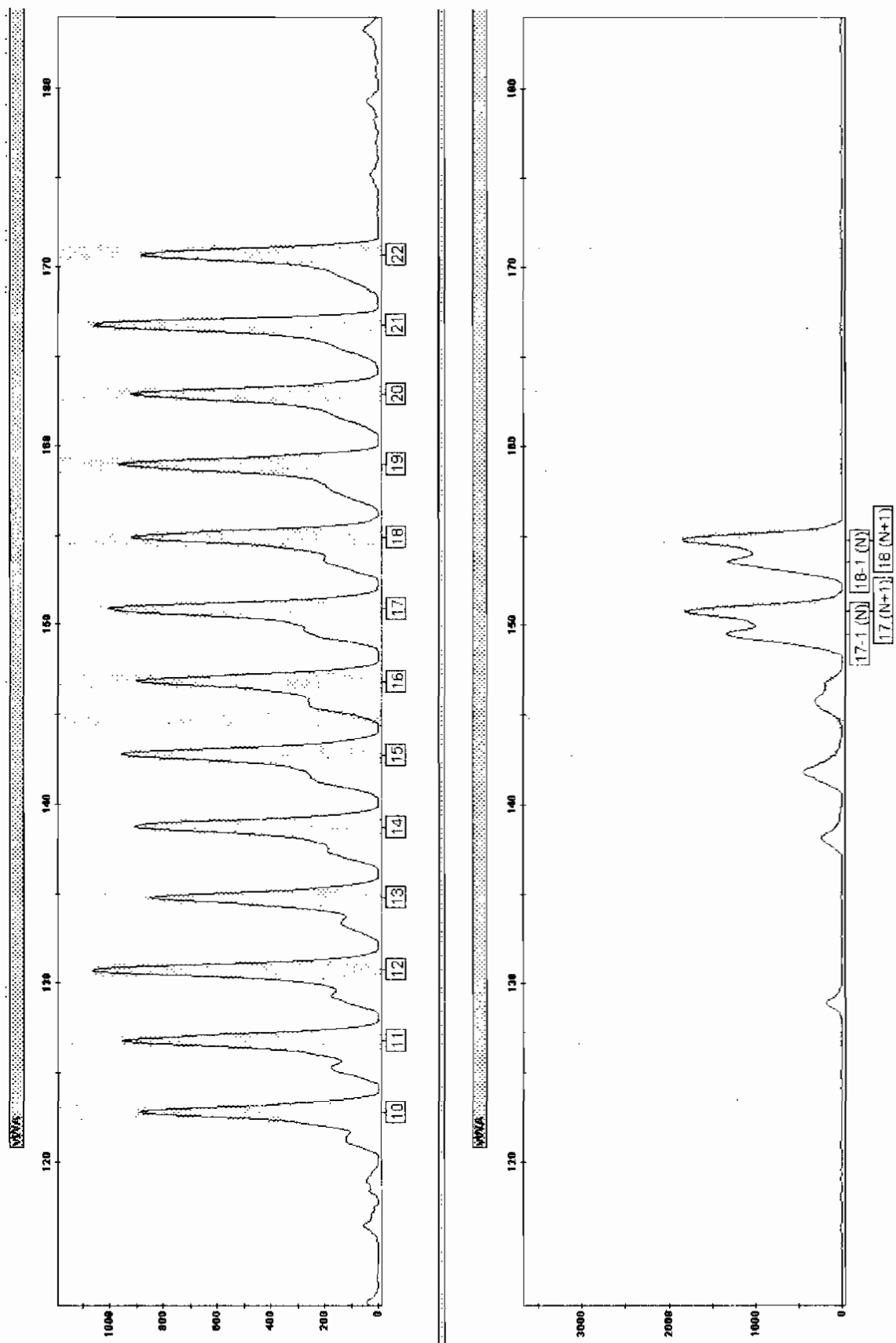


Рис. 4.18. Неспецифические явления – N-фрагменты

В результате этого свойства на основе матричной цепи ДНК синтезируются два типа фрагментов: N+1-фрагменты, которые длиннее на один нуклеотид, и N-фрагменты, соответствующие истинной длине исходной ДНК. Интенсивность N-фрагментов всегда ниже, чем N+1-фрагментов. Присутствие N-фрагментов обычно не усложняет установление истинных аллелей, однако следует особенно внимательно анализировать электрофореграммы локусов, аллели которых могут отличаться на одну пару оснований (например, аллели 9.3 и 10 локуса TH01).

Особые неспецифические сигналы возникают в случае электрофореза проб с избыточным количеством продуктов ПЦР. В этом случае детекционная система прибора (цифровая камера) оказывается перенасыщенной, и становится невозможно корректно разделить флуоресцентные сигналы, получаемые в результате свечения разных флуоресцентных меток. В итоге на электрофореграммах отдельных флуоресцентных красителей детектируются фрагменты, равные по размеру (рис. 4.19).

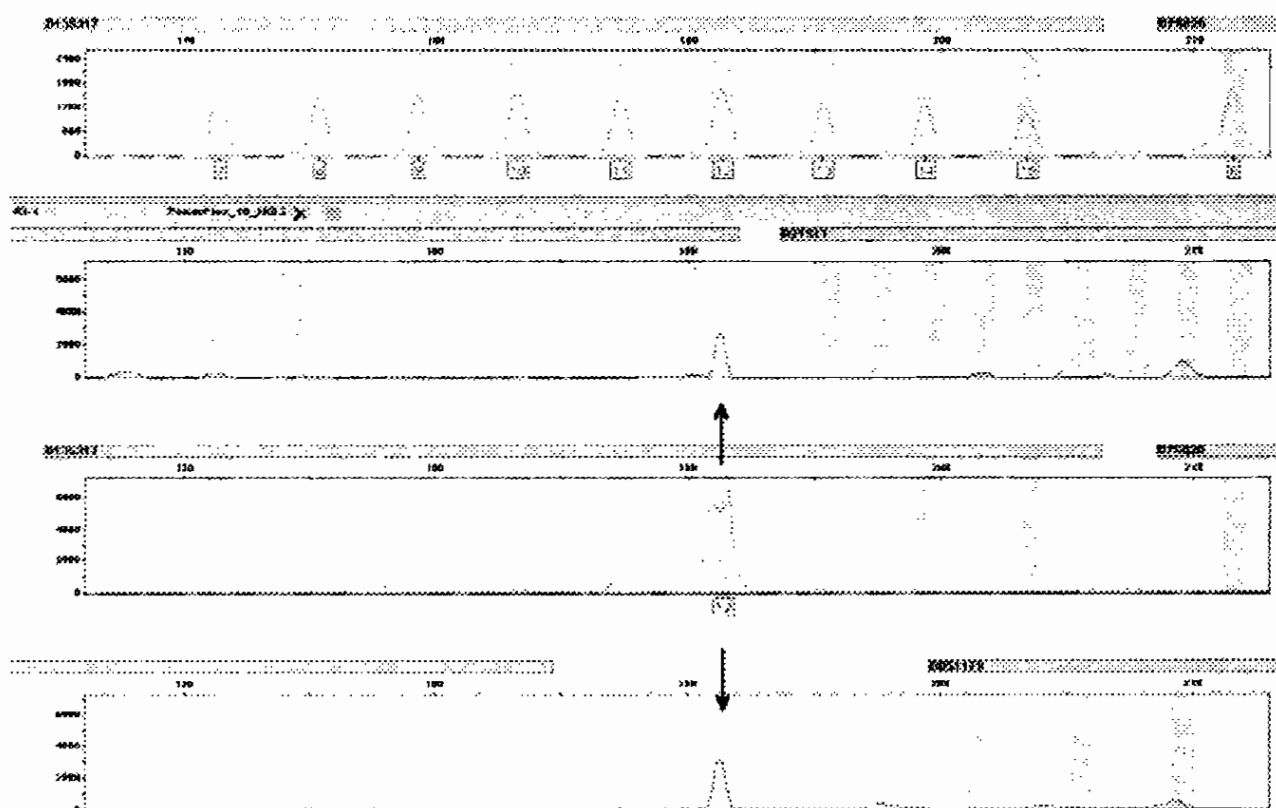


Рис. 4.19. Неспецифические явления, возникающие в случае электрофореза проб с избыточным количеством продуктов ПЦР

Истинным фрагментом является только тот, у которого интенсивность свечения (высота пика) является большей. Сигналы других флуоресцентных красителей, равные по размеру, но меньшие по интенсивности следует считать неспецифическими. При неясных случаях следует повторить электрофорез с внесением меньшего количества продуктов ПЦР.

Фрагменты, которые были определены как статтеры или иные неспецифические фрагменты, в дальнейшем исследовании не учитывают.

Экспертный анализ результатов электрофореза начинают с изучения электрофореграмм контролей реакции амплификации и контролей выделения ДНК.

Данные считаются достоверными, если: а) в отрицательных контролях реакции амплификации и контролях выделения ДНК отсутствуют амплифицированные фрагменты; б) профиль ДНК, выявленный в положительном контроле реакции амплификации, соответствует генотипу контрольной ДНК.

После оценки электрофореграмм контролей проводят анализ электрофореграмм исследуемых проб ДНК.

Сравнение установленных генетических признаков по STR-локусам и их интерпретация зависит от задач исследования. При исследовании объектов, содержащих ДНК одного лица, и сравнении их генетических признаков с генетическими признаками определенных лиц возможны два варианта:

1) генетические признаки исследуемых объектов полностью совпадают.

2) генетические признаки исследуемых объектов имеют различия.

В первом случае это означает, что исследуемые объекты могут иметь общий источник происхождения (один и тот же индивидуум или его однояйцовый близнец). Однако не исключается случайное совпадение генетических признаков неродственных лиц.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные этапы исследования ядерной ДНК.
2. Охарактеризуйте объекты исследования.

3. Что влияет на выбор того или иного метода выделения ДНК?
4. С какими основными методами выделения ДНК вы познакомились?
5. Что такое ПЦР?
6. Охарактеризуйте три фазы цикла амплификации.
7. Какие компоненты нужны, чтобы поставить ПЦР?
8. Что такое праймеры?
9. Что такое амплификатор?
10. Какие амплификационные системы используются в настоящее время?
11. Особенности мультипликационных систем.
12. Каков принцип метода RT-PCR?
13. Что такое зонд TaqMan?
14. В каких целях применяют RT-PCR в судебно-генетических исследованиях?
15. Что представляет собой калибровочный график для определения концентрации ДНК?
16. Перечислите возможные варианты контроля ПЦР.
17. Охарактеризуйте метод электрофореза.
18. Что является средой для электрофореза?
19. Как происходит электрофорез в автоматизированных приборах?
20. Что такое внутренний стандарт?
21. Какие варианты автоматизированных систем для электрофореза ДНК существуют в настоящее время?
22. Перечислите достоинства и недостатки каждого варианта.
23. Для чего нужна программа GeneMapper ID?
24. Что такое лэддер?
25. Охарактеризуйте термины статтеры, N-фрагменты.
26. Когда полученные данные считаются достоверными?
27. Как оценивают достоверность события?

5. ОБРАБОТКА И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ДНК И ЗАКЛЮЧЕНИЕ ЭКСПЕРТОВ

5.1. Вероятностно-статистическая оценка идентификационной значимости результатов исследования

Оценка вероятности события. После экспертного анализа проводят вероятностно-статистическую оценку идентификационной значимости полученных результатов.

Оценка вероятности данного события проводится на основе популяционных исследований частот встречаемости аллелей STR-локусов. Чем реже частота встречаемости в популяции установленного генотипа, тем ниже вероятность случайного совпадения генетических признаков неродственных лиц и тем выше идентификационная значимость исследования.

При установлении различий в генетических признаках исследуемых объектов достаточно обнаружить несовпадение в одном исследованном STR-локусе для исключения происхождения исследуемых объектов от одного лица. Для такого исключения целесообразно обнаружить более одного несовпадения, что компенсирует вероятность ложного генотипирования отдельных локусов.

Если в профиле исследуемого объекта выявлено более двух специфических фрагментов, то это может свидетельствовать о смеси ДНК нескольких лиц.

Важным отличием профиля «смешанного» объекта от профиля объекта, содержащего ДНК одного человека, является то, что профиль, выявляемый при исследовании объекта, содержащего ДНК нескольких лиц, может отличаться от составляющих его аллельных профилей. Любое попарное сочетание выявленных аллелей будет соответствовать генотипу лица, от которого не исключается происхождение исследуемого объекта. Если у лица имеются аллели, отсутствующие в профиле объекта, то происхождение от него данного объекта исключается.

В исследованиях *по установлению родства* используются иные подходы. Задачей исследования является установление возможно-

сти происхождения конкретного лица (ребенка) от одного или двух предполагаемых родителей. Особенностью анализа результатов исследования родства по сравнению с идентификационным исследованием является то, что каждый родитель передает своему ребенку только один аллель каждого локуса ДНК. Это означает, что потенциальным родителем ребенка может быть любой человек, имеющий в своем генотипе хотя бы один, одинаковый с генотипом ребенка аллель по каждому исследованному локусу. В противном случае родство исключается.

Однако следует иметь в виду, что мутации, происходящие в полиморфных локусах, могут приводить к несовпадению генотипов ребенка и его истинного родителя, поэтому исключение родства допустимо только при установлении несовпадений не менее чем в трех локусах ДНК.

Применение теории вероятностей в экспертизе по исследованию ДНК. Главное назначение применения законов теории вероятностей в экспертизе по исследованию ДНК заключается не в простом расчете значения вероятности какого-то события, а в определении степени его стремления к значению достоверного или невозможного события. Иначе говоря, с помощью теории вероятностей можно показать, что генетические признаки обладают или же не обладают такой идентификационной значимостью, которая позволяет утверждать, что вероятность наступления определенных событий близка либо к единице, либо к нулю. В соответствии с принципом «пренебрежения достаточно малыми вероятностями» такое событие справедливо считают практически достоверным.

Наблюдаемые совпадения генетических признаков между исследуемым объектом и проверяемым лицом может быть обусловлено одним из двух событий. Во-первых, проверяемое лицо является тем лицом, от которого произошел исследуемый объект. Во-вторых, проверяемое лицо не является таким лицом, а его генетические признаки случайно совпадают с исследуемым объектом. Если установленные в результате исследования генетические признаки обладают высокой идентификационной значимостью, то, на первый взгляд, может показаться, что вероятность первого события должна быть близка к единице, а вероятность второго – к нулю. Однако очевидно, что оба события являются **совместимыми**.

Первое событие представляет собой достоверное событие, и, следовательно, его вероятность всегда должна быть равна единице (независимо от идентификационной значимости генетических признаков). Второе событие, напротив, является случайным, и его вероятность коррелирует с идентификационной значимостью исследуемых признаков. Поэтому вероятность этого события может быть использована при оценке идентификационной значимости признаков.

Следует также отметить, что событию, когда проверяемое лицо является случайным и его генетические признаки случайно совпадают с исследуемым объектом, соответствует противоположное событие. Данное событие заключается в том, что генетические признаки случайного лица и исследуемого объекта не совпадают и происхождение объекта от него исключается. Вероятность именно этого события близка к единице, когда генетические признаки обладают высокой идентификационной значимостью. Данная вероятность также может использоваться для оценки идентификационной значимости генетических признаков, однако ее использование в тексте или выводе заключения эксперта при отсутствии каких-либо объяснений может восприниматься как вероятность происхождения объекта, что некорректно и недопустимо.

Таким образом, в настоящее время существует несколько способов оценки идентификационной значимости генетических признаков, которые обладают своими преимуществами и недостатками.

Первый (и наиболее распространенный) способ заключается в оценке величины вероятности события: совпадения генетических признаков исследуемого объекта и случайного лица, т.е. в оценке значения *вероятности случайного совпадения* генетических признаков. Чем меньше величина этой вероятности, тем меньше вероятность того, что проверяемое лицо является случайным, и тем выше идентификационная значимость генетических признаков.

Другой способ заключается в оценке вероятности противоположного события: исключения происхождения объекта от случайного лица, т.е. в оценке значения *вероятности исключения совпадения* генетических признаков со случайным лицом. Чем больше величина этой вероятности, тем меньше вероятность того, что про-

веряемое лицо является случайным и тем выше идентификационная значимость генетических признаков.

Следующий способ заключается в оценке величины вероятности встречаемости в популяции лица, обладающего генетическими признаками, выявленными в исследуемом объекте. По сути получаемая при данном способе оценки величина вероятности совпадает с величиной вероятности случайного совпадения генетических признаков. Однако представляется, что данный способ оценки величины вероятности случайного совпадения генетических признаков является наилучшим для понимания. При использовании в заключениях эксперта только значения вероятности случайного совпадения генетических признаков данная вероятность может восприниматься как абстрактное понятие и не будет оценено должным образом, поэтому целесообразнее использовать данные два метода одновременно.

От перечисленных способов принципиально отличается способ, при котором оценивается величина отношения правдоподобия (*likelihood ratio*). При этом устанавливают вероятности положительных исходов двух альтернативных событий или двух противоположных гипотез¹, объясняющих происхождение объекта, имеющего профиль E :

$$LR = \frac{P(E | C)}{P(E | \bar{C})}.$$

Первая гипотеза (C) заключается в том, что исследуемый объект, имеющий профиль E , действительно произошел от проверяемого лица. Вторая гипотеза (\bar{C}), противоположная первой, заключается в том, что исследуемый объект произошел от случайного лица, имеющего профиль E .

В простых случаях положительный исход при условии верности гипотезы C представляет собой достоверное событие, вероятность которого равна единице. При этом идентификационная значимость генетических признаков зависит только от величины вероятности положительного исхода при справедливости гипотезы \bar{C} , представляющей собой вероятность случайного совпадения гене-

¹ Следует отметить, что рассматриваемые здесь события не являются математически противоположными и не образуют полную группу событий.

тических признаков. В этих случаях способы оценки идентификационной значимости генетических признаков совпадают.

В сложных экспертных случаях, например, когда анализируются биологические смеси или родство, осуществление положительного исхода при условии верности гипотезы C может быть связано с каким-либо условием или условиями (определяются обстоятельствами дела) и его вероятность будет меньше единицы. При этом идентификационная значимость генетических признаков зависит от соотношения вероятностей положительных исходов в случае выполнения одной из двух гипотез. В этих случаях способ оценки с помощью LR имеет преимущества, так как позволяет наиболее полно учитывать все обстоятельства дела.

Вычисленная величина LR показывает, во сколько раз вероятность положительного исхода при выполнении гипотезы C больше, чем вероятность положительного исхода при справедливости гипотезы \bar{C} . Чем значение LR больше, тем выше идентификационная значимость генетических признаков. Значение LR равно единице, когда вероятности положительных исходов обеих гипотез равны, – в этом случае ни одна из гипотез не имеет преимуществ. Если LR меньше единицы, т.е. вероятность положительного исхода при справедливости гипотезы \bar{C} больше, чем вероятность положительного исхода при верности гипотезы C , тогда чем меньше величина LR , тем выше вероятность того, что факт совпадения генетических признаков у сравниваемых объектов обусловлен случайными причинами.

Принцип определения величин вероятностей событий, изучаемых в экспертизе по исследованию ДНК. Расчеты величин вероятности случайного совпадения генетических признаков или вероятностей гипотез, объясняющих экспертный случай, сводятся к установлению вероятности встречаемости в популяции лица (группы лиц), обладающего определенными генетическими признаками. Данная вероятность теоретически будет равна частоте встречаемости в популяции такого лица (группы лиц).

Методы расчета частот генотипов в популяции основываются на законе Харди–Вайнберга, названной так по именам установивших ее в 1908 г. ученых. Смысл этого закона сводится к тому, что частоты аллелей из поколения в поколение в популяции будут ос-

таваться постоянными при соблюдении определенных условий: популяция должна быть достаточно велика, чтобы обеспечить возможность случайного сочетания признаков; должен отсутствовать отбор, благоприятствующий (или неблагоприятствующий) определенным признакам; не должно возникать мутаций; не должна происходить миграция между популяциями.

В естественных условиях данные ограничения часто не соблюдаются, однако это принципиально не оказывает влияние на выполнение закона Харди–Вайнберга. Это может быть связано с тем, что численность природных популяций достаточно большая, избирательность при скрещивании не оказывает влияния на большинство генетических признаков, мутации происходят достаточно редко, естественный отбор не оказывает заметного влияния на частоту большинства аллелей, популяции в достаточной степени изолированы друг от друга.

Таким образом, использование закона как математической модели позволяет в большинстве случаев с достаточной степенью приближения определять частоты встречаемости признаков (и, соответственно, генотипов) в популяции.

Согласно закону частоты всех аллелей одного локуса ДНК в популяции постоянны, а их сумма равна 1. Если в локусе n аллелей, то

$$p_1 + p_2 + \dots + p_n = 1,$$

где p_1, p_2, p_n – частоты аллелей, обозначенных номерами 1, 2, ... n .

Сумма частот всех генотипов одного локуса также равна 1, а так как каждый из генотипов содержит по два аллеля, то математически равна квадрату суммы частот аллелей:

$$\begin{aligned} (p_1 + p_2 + \dots + p_n)^2 = \\ = p_1^2 + 2p_1p_2 + p_2^2 + \dots + 2p_1p_n + 2p_2p_n + \dots + p_n^2 = 1, \end{aligned}$$

где $p_1^2, p_2^2, \dots, p_n^2$ – частоты встречаемости гомозиготных генотипов; $2p_1p_2, \dots, 2p_1p_n, 2p_2p_n$ – частоты встречаемости гетерозиготных генотипов.

Конкретные значения частот встречаемости аллелей (p), используемых при вероятностно-статистической оценке идентификационной значимости результатов исследования ДНК, устанавливаются экспериментально в результате популяционных исследований населения.

Расчет значения вероятности встречаемости в популяции лица, обладающего определенными генетическими признаками по нескольким локусам, которые не являются сцепленными (наследование по ним происходит независимо), проводится согласно теореме умножения вероятностей (произведение вероятностей встречаемости признаков, вычисленных по каждому из локусов):

$$P = P_1 \cdot P_2 \cdot \dots \cdot P_n,$$

где P_1, P_2, \dots, P_n – значения вероятностей встречаемости признаков, вычисленных по локусам, обозначенным номерами 1, 2, ... n .

Рассмотрим пример расчета вероятности случайного совпадения генетических признаков исследуемого объекта и проверяемого лица. В табл. 5.1 показаны результаты исследований ДНК.

Таблица 5.1

Данные анализов ДНК

Исследованный локус	Число выявленных аллелей	Частота встречаемости аллеля p	Формула расчета	Вероятность случайного совпадения P
F13A01	6	0,333	p_6^2	0,1109
F13B	9	0,249	p_9^2	0,0620
FESFPS	12 13	0,192 0,057	$2p_{12}p_{13}$	0,0219
LPL	10 12	0,439 0,235	$2p_{10}p_{12}$	0,2063
Penta E	7 17	0,171 0,047	$2p_7p_{17}$	0,0161
D18S51	15 16	0,168 0,116	$2p_{15}p_{16}$	0,0390
D21S11	28	0,152	p_{28}^2	0,0231
TH01	6	0,220	p_6^2	0,0484
D3S1358	14	0,117	p_{14}^2	0,0137
FGA	22 23	0,188 0,150	$2p_{22}p_{23}$	0,0564
TPOX	8 10	0,537 0,069	$2p_8p_{10}$	0,0741
D8S1179	13 14	0,319 0,183	$2p_{13}p_{14}$	0,1168
vWA	15 19	0,106 0,067	$2p_{15}p_{19}$	0,0142

Исследованный локус	Число выявленных аллелей	Частота встречаемости аллеля p	Формула расчета	Вероятность случайного совпадения P
Penta D	13	0,206	$2p_{13}p_{14}$	0,0235
	14	0,057		
CSF1PO	12	0,272	p_{12}^2	0,0740
D16S539	12	0,278	p_{12}^2	0,0773
D7S820	8	0,141	$2p_8p_{11}$	0,0674
	11	0,239		
D13S317	11	0,341	$2p_{11}p_{12}$	0,1685
	12	0,247		
D5S818	11	0,369	$2p_{11}p_{12}$	0,2583
	12	0,350		
			Итого	$8,166 \cdot 10^{-25}$ или $1/1,224 \cdot 10^{24}$

Вероятность случайного совпадения генетических признаков, выявленных в ДНК исследуемого объекта и проверяемого лица, по совокупности признаков составляет $8,166 \cdot 10^{-25}$.

Полученная величина означает, что выявленным сочетанием генетических признаков теоретически обладает один из $1,224 \cdot 10^{24}$ мужчин.

5.2. Выводы по результатам экспертизы

По результатам проведения судебно-генетического исследования формулируются выводы, которые принципиально можно разделить на три основных типа: категоричный положительный, вероятностный положительный и категоричный отрицательный.

Категоричный положительный вывод означает, что исследуемый объект произошел от конкретного лица, генетические признаки которого были изучены в экспертном исследовании. Типичная формулировка вывода может быть следующей: "следы крови, обнаруженные на ... произошли от гр. Иванова". До недавнего времени категоричный положительный вывод по результатам генетической экспертизы был чрезвычайно редок. Это было связано с объективными экономическими и техническими причинами, которые не позволяли сузить группу лиц, от которого мог произойти

исследуемый объект, до одного конкретного лица. В связи с усовершенствованием технологии генетического исследования такая формулировка вывода в настоящее время стала возможной.

Положительный вероятностный вывод означает, что изученные генетические признаки исследуемого объекта и генетические признаки лица проходящего по делу совпадают, однако, кроме данного лица, теоретически и практически могут существовать лица с такими же генетическими признаками, которые не исключали бы происхождение от них исследуемого объекта.

Типичная формулировка вывода может быть следующей: «Следы крови, обнаруженные на ... могли произойти от гр. Иванова, вероятность случайного совпадения генетических признаков выявленных в исследованных следах крови и крови гр. Иванова составляет $1 \cdot 10^{-3}$ (это означает, что данными генетическими признаками обладает один человек из одной тысячи)». Применение такой формулировки вывода в настоящее время обычно связано с отсутствием необходимых материалов для проведения исследования, позволяющего дать категоричный положительный или отрицательный вывод. При дальнейшем совершенствовании технологий ДНК-анализа ожидается, что доля вероятностных выводов будет значительно снижена.

Категоричный отрицательный вывод означает, что выявлены различия в генетических признаках исследуемого объекта и лица, проходящего по делу, что опровергает возможность происхождения от него данного объекта. Типичная формулировка такого вывода может быть следующей: "следы крови, обнаруженные на ... не произошли от гр. Иванова".

Экспертный вывод должен быть *определенным и доступным для понимания лиц, не обладающих специальными познаниями*. Например, нельзя считать корректным вывод следующего содержания: "генетические признаки следов крови совпадают с генетическими признаками крови гр. Иванова ...". Данная формулировка для лица, не обладающего специальными познаниями, может означать, что исследованные следы произошли от гр. Иванова, так и то, что не произошли от него. Факт совпадения генетических признаков может интерпретировать лишь эксперт.

5.3. Заключение эксперта

В соответствии с УПК в *заключении эксперта* должно быть указано когда, где и кем произведена экспертиза, основания ее производства и, кто присутствовал при проведении экспертизы, какие материалы эксперт использовал, какие вопросы были перед ним поставлены и его мотивированные ответы на них.

Оценка заключения эксперта по результатам генетического исследования, кроме обычной проверки соблюдения процессуального порядка назначения и проведения экспертизы, предусмотренных действующим законом, имеет и свои *особенности*. Следует иметь в виду, что оценка заключения и экспертного вывода, сделанного на основе исследования, проведенного с использованием специальных познаний, часто представляет сложности для лиц, не обладающих такими познаниями.

Особенностью заключения эксперта по результатам генетического исследования является необходимость подробного описания исследовательской части. Информации, которая содержится в этой части должно быть достаточно для полного повторения в независимом экспертном исследовании. Это необходимо для возможности полноценной оценки проведенных исследований, установления научной обоснованности использованных методик и пригодности их для применения в данном конкретном экспертном исследовании. В противном случае заключения эксперта, не содержащие такого описания в исследовательской части могут вызывать сомнения при проведении судебного процесса.

Пример заключения эксперта:

... Обстоятельства дела:

22.07.2009 около 6 часов у д. 20 по ул. Революции Московского района г. Иркутска в подвальной нише был обнаружен труп неизвестного мужчины с признаками насильственной смерти. В ходе следствия была установлена личность погибшего – Давыдов Илья Николаевич, 1975 г.р. В качестве обвиняемых по данному уголовному делу были привлечены Семенов А.Р., Григорьев А.В. и Краснов С.С. У обвиняемого Краснова С.С. была изъята одежда, на которой была обнаружена кровь человека.

На разрешение экспертизы поставлен вопрос:

- не принадлежит ли данная кровь потерпевшему Давыдову И.Н. или обвиняемым Семенову А.Р., Григорьеву А.В., Краснову С.С. или другому лицу?

На экспертизу представлены:

джинсы; образцы крови Давыдова И.Н., Семенова А.Р., Григорьева А.В., Краснова С.С.; копия заключения эксперта Иркутского областного бюро судебно-медицинской экспертизы № 539 от 10 октября 2009 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ

При исследовании руководствовались методическими рекомендациями: «Пименов М.Г., Культин А.Ю., Кондрашов С.А. Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа: Учебное пособие. – М: ГУ ЭКЦ МВД России, 2001».

1. Объекты исследования

Объекты исследования поступили на экспертизу в двух свертках.

Сверток из полимерного материала белого цвета с текстом зеленого цвета «ЭКОНТА». На свертке с помощью бесцветной липкой ленты прикреплен фрагмент бумаги желто-белого цвета с надписью «Экспертиза № ... Вещ. док во: – джинсы «H&K» Краснова С.С. СМЭ: ... (подпись) Малиева Т Ю лаб: ... (подпись) Смирнова Т.М.» и оттиском круглой печати «Биологическое отделение лаборатории Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы». В свертке находятся джинсовые брюки из материала синего цвета. Брюки застегиваются на пуговицу с текстом «H&K JEANS» из металла белого цвета и замок типа "молния" из металла желтого цвета. На внутренней стороне пояса имеется фрагмент ткани синего цвета с текстом «H&K JEANS WEAR». На передней поверхности брюк имеются два прорезных и один накладной карман, на задней поверхности – два накладных кармана. Длина по боковому шву 114 см, окружность в поясе 84 см. Брюки ношенные, загрязненные. На брюках имеются повреждения ткани и обозначения фрагментами лейкопластыря после проведения первичной экспертизы. На передней поверхности левой половины брюк, на расстоянии 11 см от наружного бокового шва и 34 см от верхнего края имеется группа пятен вещества бурого цвета размерами от 0,3×0,4 см до 0,4×0,7 см (объект № 1). На нижней трети передней поверхности левой половины брюк на расстоянии 9 см от внутреннего бокового шва и 20,5 см от нижнего края имеются пятна вещества бурого цвета размерами от 0,1×0,3 см до 0,2×0,3 см (объект № 2).

Сверток из бумаги желто-белого цвета, на который с помощью бесцветной липкой ленты прикреплен фрагмент бумаги белого цвета с текстом «Экспер. № Вещ-е док-во: I/ образцы крови и слюны Семенова А.Р., Краснова С.С., Григорьева А.В., образцы крови Давыдова И.Н. Лаборант ... (подпись) Л.В. Романюк/ ... (подпись) И.В. Семина» и оттиском круглой печати «Биологическое отделение лаборатории Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы». В свертке находятся четыре свертка из бумаги желтого цвета:

- в свертке с надписью «Образцы крови и слюны на марле гр-на Григорьева А. В. ...» находится фрагмент марли, почти полностью пропитанный кровью;

- в свертке с надписью «Образцы крови и слюны на марле гр-на Краснова С.С. ...» находится фрагмент марли, почти полностью пропитанный кровью;

- в свертке с надписью «образцы крови и слюны на марле гр-на Семенова А.Р....» находится фрагмент марли, почти полностью пропитанный кровью;

- в свертке с надписью «Кровь от трупа ... опознан как Давыдов И.Н. ...» находится фрагмент марли, частично пропитанный кровью.

Согласно заключению эксперта Иркутского областного бюро судебно-медицинской экспертизы № 539 от 10 октября 2009 г. пятна вещества бурого цвета (объект № 1, 2) образованы кровью человека группы А (II).

2. Исследование ДНК

2.1. Выделение ДНК

ДНК из крови (объекты №№1,2) и образцов крови Давыдова И.Н., Семенова А.Р., Григорьева А.В. и Краснова С.С. выделяли с помощью ионообменной смолы Chelex 100. ДНК, выделенную из крови (объекты №№ 1,2), концентрировали с помощью устройства Centricon 100, производства фирмы "Amicon", США.

2.2. Оценка выделенной ДНК

Для количественной оценки ДНК, выделенной из крови (объекты №№ 1,2) применяли полимеразную цепную реакцию в реальном времени, используя набор реагентов Quantifiler Human DNA Quantification Kit производства фирмы Applied Biosystems (США) в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией. Реакцию амплификации и детекцию проводили с помощью прибора ABI Prism 7000 Sequence Detection System, фирмы Applied Biosystems (США). Обработку полученных данных проводили с помощью программы ABI Prism 7000 Sequence Detection System software Version 1.2.3.

Результаты определения концентрации ДНК представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты определения концентрации ДНК

Объекты исследования	Концентрация ДНК в растворе, нг/мкл
Объект № 1	0,248
Объект № 2	0,385

Для проведения успешного типирования локусов ядерной ДНК концентрация ДНК должна быть не менее 0,05 нг/мкл

Установлено, что в пробах ДНК (объекты №№ 1, 2) содержится ДНК человека в количестве, достаточном для исследования ядерной ДНК.

Количественную и качественную оценку выделенной ДНК из образцов крови Давыдова И.Н., Семенова А.Р., Григорьева А.В. и Краснова С.С. проводили методом горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующей окраской геля бромидом этидия. В качестве стандарта длин фрагментов ДНК использовали "pGEM DNA Markers" производства фирмы "Promega Corporation", США.

Установлено, что из образцов крови Давыдова И.Н., Семенова А.Р., Григорьева А.В. и Краснова С.С. выделена высокомолекулярная ДНК величиной фрагментов более 3 тыс. п.н.

2.3. Типирование локусов ядерной ДНК

Для исследования локусов применяли полимеразную цепную реакцию, используя набор «AmpF/STR SGM Plus», производства фирмы «Applied Biosystems», США. Реакцию амплификации проводили с помощью прибора «GeneAmp PCR system 9700» фирмы «Applied Biosystems», США. Для оценки специфичности реакции амплификации использовали пробу контрольной ДНК с известными генетическими признаками: проба ДНК 007 – D3S1358 15,16; vWA 14,16; D16S539 9,10; D2S1338 20,23; Amelogenin X,Y; D8S1179 12,13; D21S11 28,31; D18S51 12,15; D19S433 14,15; TH01 7,9.3; FGA 24,26 (положительный контроль) и пробу без ДНК (отрицательный контроль). Разделение и детекцию флуоресцентно меченых амплифицированных фрагментов проводили с использованием прибора капиллярного электрофореза 3130 Genetic Analyzer, производства фирмы «Applied Biosystems», США в среде полимера POP4. Определение длин амплифицированных фрагментов и установление номеров аллелей проводили на основе внутреннего стандарта длины (GeneScan 500 ROX Size Standard) и входящего в наборы реагентов аллельных леддеров с помощью программного комплекса GeneMapper ID v 3.2.

Результаты исследования локусов ДНК представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты типирования локусов, установленные генотипы

Исследованный локус	Кровь (объекты №№ 1,2)	Образец крови Давыдова И.Н.	Образец крови Семенова А.Р.	Образец крови Григорьева А.В.	Образец крови Краснова С.С.	Положительный контроль	Отрицательный контроль
D3S1358	16, 17	16, 17	15, 18	16, 17	14, 15	15, 16	-
vWA	16, 18	16, 18	17, 18	15, 18	16, 18	14, 16	-
D16S539	12, 12	12, 12	12, 13	11, 13	9, 13	9, 10	-
D2S1338	16, 18	16, 18	23, 25	20, 25	16, 20	20, 23	-
Amelogenin	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	-
D8S1179	14, 14	14, 14	12, 12	13, 15	13, 14	12, 13	-

Исследованный локус	Кровь (объекты №№ 1,2)	Образец крови Давыдова И.Н.	Образец крови Семенова А.Р.	Образец крови Григорьева А.В.	Образец крови Краснова С.С.	Положительный контроль	Отрицательный контроль
D21S11	29, 30	29, 30	29, 31.2	30, 33.2	32.2, 33.2	28, 31	-
D18S51	16, 17	16, 17	13, 17	12, 18	16, 19	12, 15	-
D19S433	15, 16.2	15, 16.2	14, 14	12, 14	15.2, 16	14, 15	-
TH01	6, 9.3	6, 9.3	6, 8	9, 9.3	9, 9.3	7, 9.3	-
FGA	19, 20	19, 20	21, 24	22, 24	20, 25	24, 26	-

Примечания: 1. Аллели обозначены номерами в соответствии с принятыми международными номенклатурами.

2. Амплифицированные фрагменты не выявлены.

2.4. Анализ и вероятностная оценка результатов типирования локусов ДНК

В результате исследования пол-специфичного сегмента амелогенинового гена ДНК, выделенной из крови (объекты №№ 1,2), выявлены X и Y специфичные фрагменты. Кровь (объекты №№ 1,2) произошла от лица мужского генетического пола.

В ДНК крови (объекты №№ 1,2) во всех 10 исследованных локусах выявлены аллели, присущие генотипу Давыдова И.Н. Кровь (объекты №№ 1,2) могла произойти от Давыдова И.Н. Происхождение крови (объекты №№ 1,2) от Краснова С.С., Семенова А.Р. и Григорьева А.В. исключается.

Расчет вероятности случайного совпадения генетических признаков, выявленных в исследованных локусах проведен на основе статистических данных о частоте встречаемости аллелей у жителей России (см. М.Г. Пименов, С.А. Кондрашов, И.В. Стороженко, А.Ю. Культин, К.В. Бакун Исследование частот встречаемости аллелей STR-локусов среди жителей России Информационное письмо М.: ЭКЦ МВД России, 2004) и представлен в таблице 3.

Таблица 3

Расчет вероятности случайного совпадения генетических признаков, выявленных в крови (объекты №№ 1, 2) и крови Давыдова И.Н.

Исследованный локус	Выявленные аллели	Частота встречаемости аллеля p	Формула расчета	Вероятность случайного совпадения P
D3S1358	16 17	0,2225 0,2225	$2p_{16}p_{17}$	0,0990
vWA	16 18	0,1975 0,2575	$2p_{16}p_{18}$	0,1017

Исследованный локус	Выявленные аллели	Частота встречаемости аллеля p	Формула расчета	Вероятность случайного совпадения P
D16S539	12	0,3425	p_{12}^2	0,1173
D2S1338	16 18	0,0425 0,0875	$2p_{16}p_{18}$	0,0074
D8S1179	14	0,1875	p_{14}^2	0,0352
D21S11	29 30	0,2075 0,2625	$2p_{29}p_{30}$	0,1089
D18S51	16 17	0,1400 0,1050	$2p_{16}p_{17}$	0,0294
D19S433	15 16.2	0,1825 0,0200	$2p_{15}p_{16.2}$	0,0073
TH01	6 9.3	0,2525 0,3500	$2p_6p_{9.3}$	0,1768
FGA	19 20	0,0625 0,1625	$2p_{19}p_{20}$	0,0203

Вероятность случайного совпадения генетических признаков, выявленных в крови (объекты №№ 1,2) по совокупности признаков составляет:

$$P = 0,0990 \times 0,1017 \times 0,1173 \times 0,0074 \times 0,0352 \times 0,1089 \times 0,0294 \times 0,0073 \times 0,1768 \times 0,0203 = 2,581 \cdot 10^{-14} \text{ или } 1 : 3,875 \cdot 10^{13}.$$

Полученная величина означает, что выявленным сочетанием генетических признаков теоретически обладает в среднем один из $3,875 \cdot 10^{13}$ мужчин.

Полученное значение вероятности P ($1 : 3,875 \cdot 10^{13}$) свидетельствует о том, что среди населения Земли (около $6 \cdot 10^9$ человек) теоретически только один человек обладает выявленным сочетанием генетических признаков.

ВЫВОД

Кровь на джинсах (объекты №№ 1,2) произошла от Давыдова И.Н. и не произошла от Краснова С.С., Семенова А.Р. и Григорьева А.В.»

Контрольные вопросы

1. Что такое «смешанный» объект?
2. Как можно установить родство?
3. Каким образом законы теории вероятностей находят применение в экспертизе по исследованию ДНК?
4. Какие способы оценки идентификационной значимости генетических признаков вы знаете?

5. Расскажите о способе оценки с помощью величины отношения правдоподобия.

6. На чем основываются методы расчета частот генотипов в популяции?

7. Что такое категоричный положительный вывод?

8. Что такое положительный вероятностный вывод?

9. Что такое категоричный отрицательный вывод?

10. Что должно быть отражено в заключении эксперта?

11. Какие особенности заключения эксперта по результатам генетического исследования вы знаете?

6. ВОЗМОЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК БИОЛОГИЧЕСКИХ СЛЕДОВ ЧЕЛОВЕКА

6.1. Метод секвенирования митохондриальной ДНК

Кроме рассмотренных выше методов исследования STR-локусов *ядерной* ДНК в настоящее время существует иная технология молекулярно-генетического идентификационного анализа, применяемых в мировой экспертной практике. Данная технология основана на методе секвенирования *митохондриальной* ДНК (мтДНК).

Метод исследования мтДНК с помощью секвенирования является самым точным и информативным методом анализа индивидуальных генетических вариаций, поскольку по своей сути секвенирование (от англ. sequencing –последовательность) означает расшифровку генетического кода, который в принципе уникален для каждого организма.

Что же привлекает исследователя в митохондриальной ДНК?

1. Участки мтДНК обладают высоким уровнем полиморфизма, что обусловлено высокой скоростью накопления мутаций, которая в 5–10 раз больше, чем в ядерной ДНК.

2. Возможность изучать крайне малые количества биологического материала.

3. ДНК, содержащаяся в образце, сильно деградирована и хромосомная ДНК не может быть амплифицирована, что нередко встречается в экспертной практике.

4. При установлении родства в тех случаях, когда генетическая дистанция, разделяющая родственников, больше, чем одно поколение.

Строение митохондриального генома человека. Митохондрии – это цитоплазматические органеллы, имеющие собственную ДНК, которая по своей организации отличается от ядерной. Двухцепочечная мтДНК имеет длину около 5 мкм, форму кольца, состоит из 16 569 пар оснований (рис. 6.1).

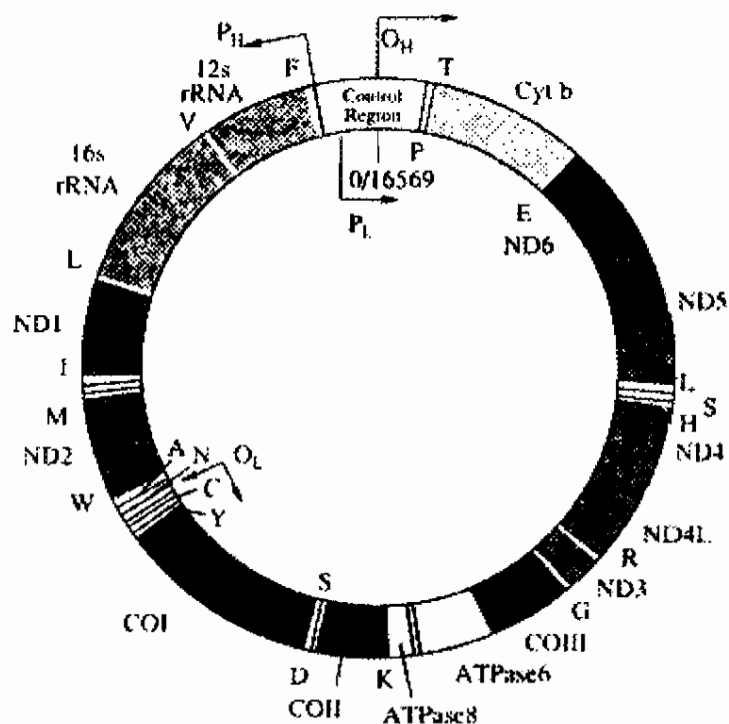


Рис. 6.1. Митохондриальная ДНК

Митохондриальный геном человека состоит из 37 генов и вариабельного некодирующего участка – контрольного региона, величиной 1122 п.н. Этот участок структурно представляет собой фрагмент молекулы мтДНК человека, локализованный в области D-петли. Контрольный участок включает два полиморфных района, условно называемых гипервариабельными сегментами (или регионами) HVI и HVII. Митохондриальная ДНК передается только по материнской линии.

Объекты для исследования митохондриальной ДНК. Потенциальные объекты для исследования мтДНК – это практически любые объекты (костные останки, кровь, слюна, мышечная ткань, сперма, волосы), содержащие ДНК.

Анализ мтДНК, как правило, не используется для исследования биологического материала, произошедшего от двух и более лиц, так как возникают проблемы с расшифровкой первичной структуры мтДНК и последующей интерпретацией результатов.

Следует отметить также и невозможность проведения исследования мтДНК в спермальной фракции после проведении дифференциального лизиса клеток, который часто применяется для отделения ДНК спермы, смешанной с какими либо тканями или выде-

лениями. Это связано с тем, что митохондрии, располагаясь в хвосте и шейке сперматозоида, утрачиваются в процессе дифференциального лизиса.

6.2. Основные этапы исследования мтДНК

Выделение мтДНК. При выделении ДНК получают не изолированную митохондриальную ДНК, а тотальную ДНК, содержащуюся в объекте, т.е. смесь митохондриальной и ядерной ДНК.

Основные методы выделения мтДНК из объектов исследования, так же как и для выделения ядерной ДНК:

1) метод, основанный на использовании ионообменной смолы Chelex 100;

2) метод выделения и очистки с помощью органических соединений, таких как фенол и хлороформ (фенольный метод);

3) метод выделения и очистки с помощью веществ, абсорбирующих ДНК, таких как соединения кремния (Silica) или синтетические сорбенты.

При постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) суммарную клеточную ДНК вводят в реакционную смесь, которая содержит необходимые компоненты для работы термостабильной ДНК-полимеразы. Субстрат-матрица для амплификации исследуемых участков ДНК – это молекулы мтДНК, которые присутствуют в препарате суммарной ДНК. Специфическим компонентом реакции и амплификационной индивидуализирующей системы в целом являются олигонуклеотидные праймеры, которые определяют, какой генетический локус будет избирательно синтезироваться в ходе реакции.

Праймеры ориентированы таким образом, что синтез новых полинуклеотидных цепей с помощью ДНК-полимеразы осуществляется только между ними, удваивая в каждом цикле количество копий этого участка ДНК.

Разные авторы предлагают различные амплификационные индивидуализирующие системы праймеров, что зависит от общей стратегии анализа мтДНК, а также от вида исследуемого объекта. В их числе независимое исследование двух гипервариабельных ре-

гионов (HVI и HVII) контрольного региона мтДНК. Для этого используют две системы праймеров для каждого из исследуемых регионов, проводя две независимые реакции амплификации. Другой вариант исследования мтДНК – амплификация перекрывающихся фрагментов внутри гипервариабельных регионов.

Параметры температурного профиля – продолжительность и температура каждой стадии реакции – зависят от структуры используемых праймеров и потому индивидуальны для каждой конкретной амплификационной системы.

В результате проведения амплификации исследователи получают смесь, в которую входят как продукты амплификации, так и исходная (матричная) мтДНК, непрореагировавшие праймеры амплификации, терминирующие моонуклеотиды (дидезоксинуклеотидтрифосфаты), полимеразы. Если использовать неочищенные продукты ПЦР в последующей реакции секвенирования – это может снизить эффективность реакции за счет изменения оптимального соотношения трифосфатов и терминаторов или приведет к неспецифическим результатам реакции секвенирования за счет неконтролируемого участия в реакции праймеров амплификации. Поэтому, для проведения дальнейшего исследования необходимо отделить амплифицированные фрагменты мтДНК от праймеров амплификации, трифосфатов и полимеразы.

Существуют два принципиальных подхода для осуществления этого этапа исследования:

- 1) выделение из смеси амплифицированных фрагментов мтДНК;
- 2) удаление из смеси праймеров амплификации, трифосфатов и полимеразы.

Оценка очищенных продуктов ПЦР позволяет определить концентрацию очищенной амплифицированной мтДНК и таким образом контролировать ход исследования. При неудовлетворительном проведении этапа очистки продуктов ПЦР, что приводит к их чрезмерным потерям, количество амплифицированной мтДНК может быть недостаточно для проведения реакции секвенирования. В этом случае необходимо остановить исследование и повторить его предыдущие этапы. Если продуктов ПЦР достаточно для проведе-

ния реакции секвенирования, то оценка концентрации амплифицированной мтДНК позволяет определить оптимальное количество продуктов ПЦР для их введения в реакцию секвенирования.

Для проведения секвенирующих реакций с последующей детекцией продуктов реакций в автоматизированных системах (секвенаторах или генетических анализаторах) существует два основных варианта:

- 1) секвенирование с использованием флуоресцентно меченных праймеров;
- 2) секвенирование с использованием флуоресцентно меченных терминаторов цепи.

В результате проведения реакции секвенирования исследователи получают смесь, в которую входят как продукты секвенирования, так и непрореагировавшие компоненты реакции.

Как и в случае очистки амплифицированных фрагментов, существуют два принципиальных подхода для осуществления этого этапа исследования:

- 1) выделение из смеси продуктов секвенирования мтДНК;
- 2) удаление из смеси непрореагировавших компонентов реакции.

Наиболее простым и доступным методом очистки секвенированных фрагментов мтДНК является осаждение продуктов секвенирования ДНК с помощью этанола или других веществ. Достоинством метода является его низкая стоимость, недостатком – большая вероятность потерь продуктов секвенирования, которые могут достигать 100 % при некачественном исполнении очистки. Другие варианты очистки более дорогостоящи, но при их использовании выше вероятность получения качественных результатов секвенирования.

При сравнении нескольких вариантов очистки было установлено, что они различаются степенью потерь продуктов секвенирования, степенью очистки и возможностью установления полной нуклеотидной последовательности от начала электрофореграммы, длительностью подготовки и процедуры очистки, трудозатратами, возможностью автоматизации и ценой.

Этапы фракционирования и детекции. *Фракционирование и детекция* флуоресцентно меченных продуктов секвенирующих реакций проводится в автоматизированных системах (секвенаторах или генетических анализаторах).

В результате фракционирования секвенированных ДНК-продуктов на приборах получают первичные графические данные электрофореграмм секвенирования исследуемых последовательностей мтДНК (рис. 6.2). Эти данные представляют собой график измерений детектором интенсивности свечения четырех флуоресцентных меток продуктов реакции секвенирования.

Расшифровка полученных электрофореграмм проводится с помощью специальных компьютерных программ, например, AB DNA Sequencing Analysis. Данная программа вводит корректировку в подвижность фрагментов ДНК в зависимости от встроенной в них метки, корректировку интенсивности свечения различных сигналов электрофореграммы с учетом заведомо известного перекрытия длин волн свечения различных меток, определяет начало и конец электрофореграммы и представляет электрофореграмму в виде последовательности пиков, обозначенных символами А, G, T, C для соответствующих дезоксирибонуклеотидов (рис. 6.3).

Сравнение установленных митотипов исследуемых объектов. Сравнение последовательностей полиморфных участков мтДНК проводят не напрямую, а опосредовано, сопоставляя на первом этапе установленные последовательности с соответствующими участками референтной последовательности мтДНК. Традиционно для референтной последовательности используют так называемую Кембриджскую референтную последовательность (от англ. Cambridge Reference Sequence, CRS) – митотип исторически первой расшифрованной последовательности мтДНК в 1981 году. Собственно сравнение установленных митотипов исследуемых объектов проводится по заменам относительно данной последовательности (рис. 6.4).

По итогам исследований возможны два варианта: 1) исследуемые последовательности мтДНК полностью совпадают; 2) исследуемые последовательности мтДНК имеют различия.

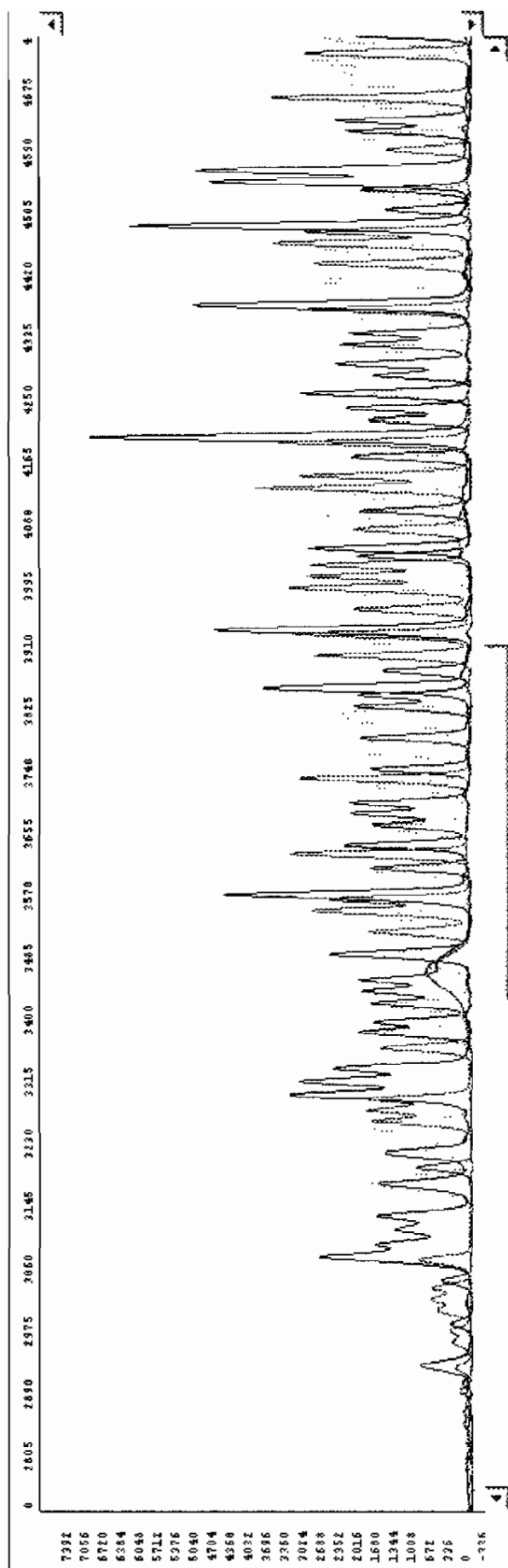


Рис. 6.2. Первичные графические данные электрофореграммы секвенирования

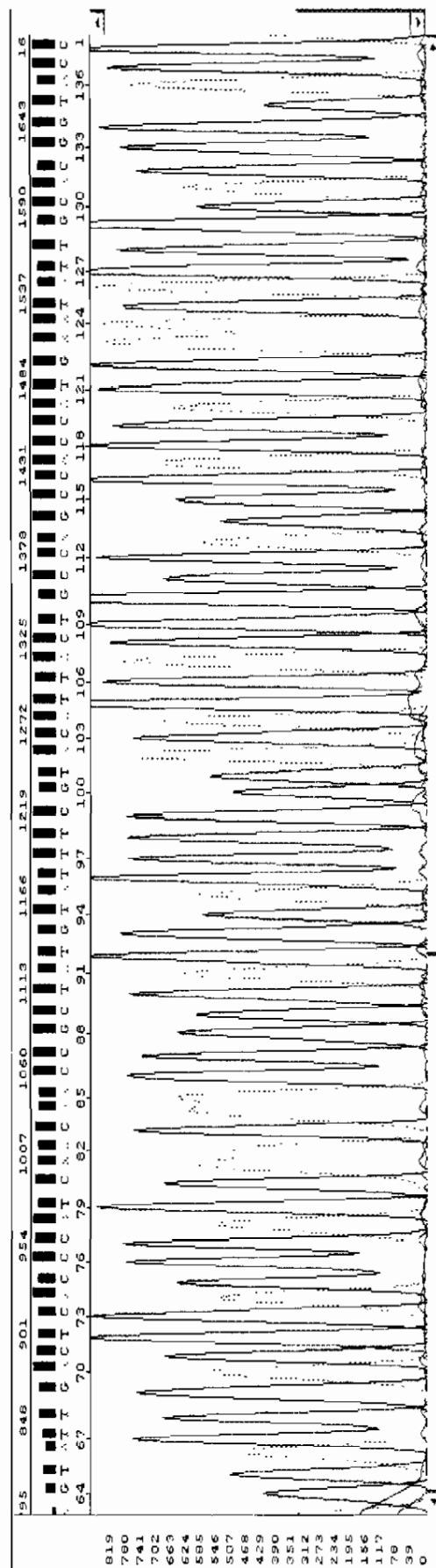


Рис. 6.3. Расшифровка полученных электрофореграмм

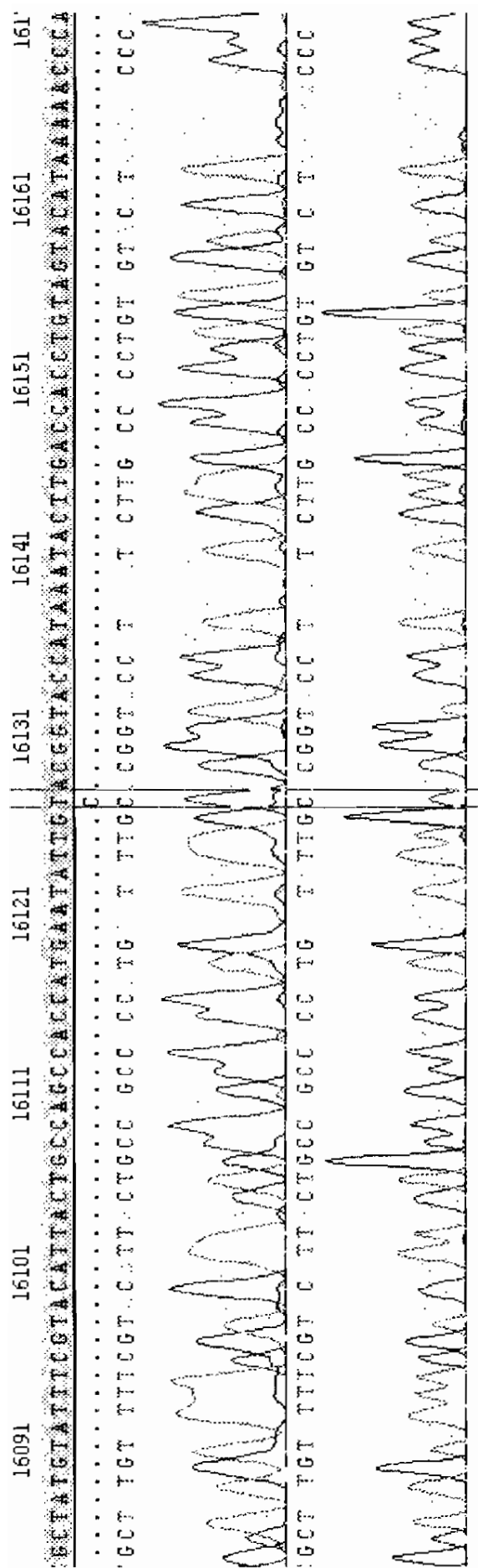


Рис. 6.4. Результаты установления нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК

В первом случае это означает, что исследуемые объекты могут иметь общий источник происхождения (один и тот же индивидуум, родственники по материнской линии). Однако, не исключается случай случайного совпадения генетических признаков неродственных лиц. Оценка вероятности данного события проводится на основе популяционных исследований частот встречаемости конкретных митотипов. Чем реже частота встречаемости в популяции установленного митотипа, тем ниже вероятность случайного совпадения генетических признаков неродственных лиц.

Во втором случае, при установлении различий в последовательностях мтДНК исследуемых объектов имеет значение характер определенных различий. Если наблюдают больше трех различий, то это указывает на исключение происхождения объектов от одного источника или отсутствие родства.

Несмотря на то, что технология исследования мтДНК является сложным многостадийным процессом, требующим применения дорогостоящего оборудования и реагентов, а также высокопрофессиональных навыков эксперта, развитие этого направления диктуется тем, что оно позволяет получать результаты в случаях исследования «сложных» биологических следов и объектов, которые ранее не исследовались.

Контрольные вопросы

1. Расскажите о методе секвенирования мтДНК.
2. Чем привлекательна мтДНК?
3. Расскажите о строении мтДНК.
4. Какие объекты для исследования мтДНК вы знаете?
5. Охарактеризуйте основные этапы исследования мтДНК.
6. Как проводят фракционирование и детекцию флуоресцентно меченных продуктов секвенирующих реакций?
7. Расскажите о расшифровке полученных электрофореграмм.
8. Как проводят сравнение последовательностей полиморфных участков мтДНК?

7. СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ ДНК

7.1. Цель создания базы данных ДНК

Этап анализа полученных материалов является наиболее простым и вместе с тем наиболее трудоемким и рутинным. Поэтому проблема автоматизации процесса производства судебной экспертизы в системе экспертных учреждений органов внутренних дел является одной из наиболее актуальных. Необходимость оперативной и объективной обработки большого количества информации требует от экспертных подразделений применения новых методов и инструментальных средств, автоматизирующих и ускоряющих проведение исследований и вычислительных процедур. С этой целью можно создать соответствующую базу данных (БД), содержащую необходимую информацию об интересующих объектах и систему управления базой данных (СУБД) – комплекс программ для обработки этих данных. Назначение такой БД может быть различным, в зависимости от нее содержание также может варьироваться. В качестве примера здесь будет рассмотрена БД, предназначенная для хранения сведений о ДНК людей и сравнения их с вновь поступающими образцами. Возможны и другие варианты назначения БД (например, для определения родственных связей людей и т.д.), но они здесь рассматриваться не будут.

В настоящее время с этой целью на основе БД ДНК экспертно-криминалистических подразделений формируется общегосударственная система с правом доступа всех заинтересованных лиц, работающих в этой области и имеющих право доступа к этой информации.

Основное назначение БД ДНК *на начальном этапе* ее формирования – обеспечение возможности оперативного сопоставления результатов ДНК-анализа, поступивших на экспертизу объектов, с результатами ранее проведенных экспертиз.

Функционирование банков ДНК осуществляется в рамках действующего уголовно-процессуального законодательства, предусматривающего хранение объектов, имеющих в уголовном деле значение вещественных доказательств (ст. 82 УПК РФ).

При наличии соответствующего поручения в постановлении лица (следователя), назначившего экспертизу, или определении суда неизрасходованная в процессе проведения биологической экспертизы часть объекта (часть следа спермы, крови и др.), а также оставшаяся после исследования проба ДНК могут быть оставлены для хранения в экспертном учреждении. Следователь должен уведомляться о целесообразности хранения такого биологического материала в банке ДНК. Экспертом в своем заключении делается соответствующая запись о помещении части неизрасходованного объекта и (или) выделенной ДНК на хранение в банк ДНК.

Необходимость в исследовании объектов, хранящихся в банке ДНК, возникает, как правило, *в следующих случаях*:

1) при поступлении сравнительных образцов, полученных от подозреваемых, если при первичном исследовании они отсутствовали и ДНК-типирование не проводилось;

2) при поступлении сравнительных образцов новых подозреваемых в случае исключения лица, образцы которого были представлены ранее;

3) при необходимости исследования дополнительных генетических признаков, которые не были установлены ранее;

4) при назначении повторной экспертизы.

Однако следует иметь в виду, что биологические объекты нестойки и со временем распадаются. По этой причине лучше хранить количественные характеристики исследованных ДНК и, конечно же, в виде данных на компьютере, так как ручная обработка их затруднена ввиду большого объема работы, которую необходимо произвести при идентификации различных образцов.

7.2. Предпроектное обследование

При предпроектном обследовании анализируется предметная область, существующие системы работы с данными и делается вывод о целесообразности автоматизации процесса работы с данными. Анализ предметной области практически показан в предыдущих главах данного пособия. Здесь же только будут сделаны основные выводы из проведенного анализа.

Рассматриваемой предметной областью является множество ДНК людей, которые однозначно определяют их владельцев.

В качестве объектов, о которых необходимо хранить данные, выступают ДНК исследованных образцов, а также данные о людях, которым они соответствуют.

Как уже известно, существует несколько методов исследования ДНК, обладающих своими достоинствами и недостатками. Однако все они трудоемки, требуют больших затрат и обладают разной степенью автоматизации. Наиболее информативным и автоматизированным в настоящее время является метод типирования локусов ядерной ДНК. Здесь по выделенным ДНК определяются их составные части (локусы), а в локусах определяются входящие в них аллели. Каждый локус содержит ровно два аллеля. Окончательно ДНК характеризуется набором входящих в них локусов и аллелей. Набор локусов, по которым затем происходит идентификация, может варьироваться примерно от 12 до 30. Два образца считаются идентичными, если у них полностью совпадут все локусы и входящие в них аллели.

Человек, которому принадлежит соответствующая ДНК, характеризуется своими параметрами, однозначно определяющими его (фамилия, имя, отчество, дата рождения, паспорт и т.д.).

Процедура сравнения двух образцов достаточно трудоемка и не лишена при ручной обработке возможности возникновения ошибки, поэтому целесообразно в данном случае использовать вычислительную технику и в частности сформировать БД образцов ядерных ДНК.

7.3. Логическое проектирование

Определив предметную область и объектную среду, можно построить логическую модель данных. Это выполняется на стадии логического проектирования. Здесь формируется структура данных без привязки к конкретным техническим и программным средствам. На стадии логического проектирования необходимо оперировать с такими понятиями, как сущность, экземпляр сущности (кортеж), атрибут, ключ и т.д.

Сущность – элемент предметной области, сведения о котором необходимо поместить в БД. В рассматриваемом случае первоначально можно взять в качестве исходной сущности сущность "*ДНК – человек*" (рис. 7.1). Так как ДНК однозначно определяет своего владельца, делить эту сущность на две на стадии логического проектирования не нужно, хотя дальше на стадии физического проектирования это может и понадобится. В дальнейшем в процессе проведения нормализации потребуется выделить и другие сущности (локусы, аллели) являющиеся составными частями исходной сущности.

ДНК - человек

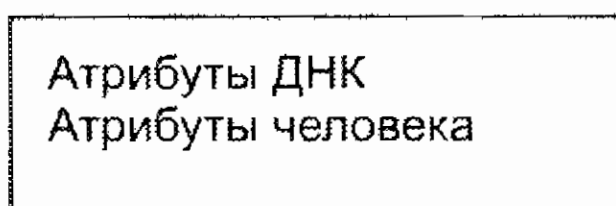


Рис. 7.1. Сущность "ДНК – человек"

Каждая сущность характеризуется набором характеристик, называемых атрибутами. *Атрибут сущности* – именованная характеристика, являющаяся некоторым свойством сущности. Так, в рассматриваемом примере человека можно описать такими параметрами, как *фамилия, имя, отчество* и т.д., а ДНК – именами входящих в нее локусов, номерами аллелей.

Любая сущность реализуется своими экземплярами. *Экземпляр сущности* – конкретный представитель данной сущности. Экземпляры сущности должны быть различимы, т.е. сущности должны иметь некоторые характеристики, уникальные для каждого их экземпляра. В рассматриваемом примере в качестве экземпляров сущности выступают конкретные наборы параметров, характеризующие определенного человека. Так как в БД целесообразно хранить данные о конкретном индивидууме только в единственном экземпляре, все экземпляры рассматриваемой сущности будут различны. Совокупность атрибутов, характеризующих конкретный экземпляр сущности, называется *кортежем*.

Чтобы все экземпляры сущности были различны, должен быть такой набор атрибутов, который будет уникален для данной сущ-

ности. Минимальный набор таких атрибутов называется *ключом*. У рассматриваемой сущности можно выделить, по крайней мере, два ключа: характеристики человека и набор характеристик, определяющий конкретную ДНК.

Если сущность не обладает ни одним ключом или ее ключи достаточно сложны (как в рассматриваемом случае), можно ввести специальный атрибут, который будет принудительно задаваться уникальным для каждого экземпляра сущности. Такой атрибут называется *искусственным ключом*.

Дальше необходимо выполнить нормализацию данных, чтобы обеспечить их непротиворечивость. В рассматриваемой системе можно наблюдать нарушение первой нормальной формы (1НФ), а именно то, что все экземпляры сущности должны содержать одно и то же число одних и тех же параметров. Это связано с тем, что число исследуемых локусов для разных ДНК может быть различно. Для устранения этой неприятности целесообразно выделить новую сущность, которую можно назвать *Локус*. В эту сущность следует поместить атрибуты, определяющие локус: имя локуса и атрибуты входящих в него аллелей.

Эти две сущности взаимосвязаны и находятся в определенном отношении. Каждому экземпляру сущности "*ДНК – человек*" соответствует несколько сущностей *Локус*, а каждому конкретному экземпляру сущности *Локус* – только одна сущность "*ДНК – человек*". Такое отношение называется "*один ко многим*". В этом случае в основной сущности (со стороны "*один*") для организации связи следует взять ключевой атрибут (ключевые атрибуты), а со стороны "*многие*" – взять атрибут такого же типа, как и в основной сущности. Этот атрибут называется *вторичным ключом*. Желательно, чтобы атрибуты, через которые осуществляется связь, были как можно проще (рис. 7.2).

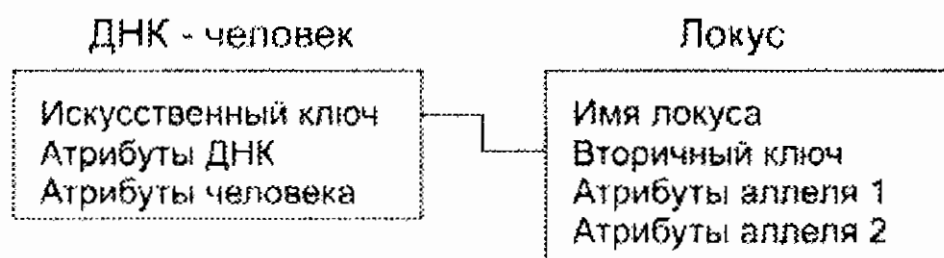


Рис. 7.2. Выделение сущности *Локус*

Так как естественные ключи сущности "*ДНК – человек*" достаточно сложны, целесообразно использовать искусственный ключ в виде числа, которое для каждого нового экземпляра сущности будет принимать новое значение (автоинкрементный атрибут).

Сформированная таким образом структура данных является нормализованной, однако в дальнейшем на стадии физического проектирования она будет еще раз скорректирована.

7.4. Физическое проектирование

На стадии физического проектирования структура данных еще раз пересматривается уже с учетом ее физической реализации. Конечно, результат будет зависеть от тех программных средств, с помощью которых будет создана эта структура (Access, SQL-сервер, Oracle и т.д.). Однако ряд общих замечаний независимо от конкретной реализации можно сделать.

При физической реализации сущности изображаются прямоугольными *таблицами*, строки которой, называемые *записями*, представляют отдельные экземпляры сущности, а *столбцы* – соответствующие атрибуты. Каждый элемент записи, содержащий значение соответствующего атрибута, называется *полем* записи.

Для физического проектирования сначала следует обратить внимание на таблицу "*ДНК – человек*", соответствующую той же сущности. Можно заметить, что все поля этой таблицы можно разбить на две группы: поля, относящиеся к ДНК, и поля, относящиеся к человеку. В процессе сравнения образцов следует использовать только информацию о ДНК, информация о конкретном человеке потребуется только на заключительном этапе работы, когда будет формироваться отчет о работе. Поэтому таблицу "*ДНК – человек*" целесообразно разбить на две: таблицу *ДНК*, содержащую информацию о ДНК, и таблицу *Человек*, содержащую информацию о человеке.

Так как имеется взаимно однозначное соответствие людей и их ДНК, т.е. каждому человеку соответствует только одна ядерная ДНК, а каждая ДНК определяет только одного человека, между этими таблицами будет отношение, которое называется "*один к од-*

ному". Связь таких таблиц осуществляется через ключевые поля. У таблицы *ДНК* уже есть ключевое поле. Такое же поле следует поместить и в таблицу *Человек*. При такой организации данных в процессе поиска нужной ДНК можно использовать только таблицу ДНК, что уменьшит требуемый объем используемой памяти и главное – увеличить скорость поиска нужной записи.

Следует также обратить внимание на таблицу *Локус*. В этой таблице используется информация об аллелях, а самих аллелей не очень много. В этом случае информацию об аллелях целесообразно выделить в отдельную таблицу, которую можно назвать *Аллель*, а в таблице *Локус* поместить ссылку на эту таблицу в виде вторичного ключа. Для каждого конкретного локуса будет одна запись из таблицы *Аллель*, а каждая запись из этой таблицы может использоваться в нескольких записях таблицы *Локус*. Таким образом, между этими таблицами будет уже известное отношение "*один ко многим*".

Таблица *Локус* в этом случае будет содержать: ключевое поле, вторичный ключ для связи с записью первого аллеля, вторичный ключ для связи с записью второго аллеля и название локуса. У таблицы *Аллель* будет ключевое поле, в качестве которого можно взять имя аллеля, потому что оно достаточно простое, а также разместить в ней вероятность того, что этот аллель может оказаться у другой ДНК. Естественно, что и у таблицы *Локус* будет такое же вторичное ключевое поле.

Таблица типа *Локус*, содержащая постоянные данные о каком-либо объекте, часто называется *справочником*. Использование справочников, хотя и усложняет структуру, но позволяет повысить достоверность вводимых данных, потому что они выбираются из заранее сформированного списка возможных значений. В такой же справочник можно поместить и имена локусов, для того чтобы в дальнейшем выбирать имена из заданного набора. Этот справочник можно назвать, например, *Имя локуса*. Такой справочник будет содержать искусственный ключ и поле с именем локуса, а в таблице *Локус* можно поместить вторичный ключ имени локуса. Окончательная структура данных приведена на рис. 7.3.

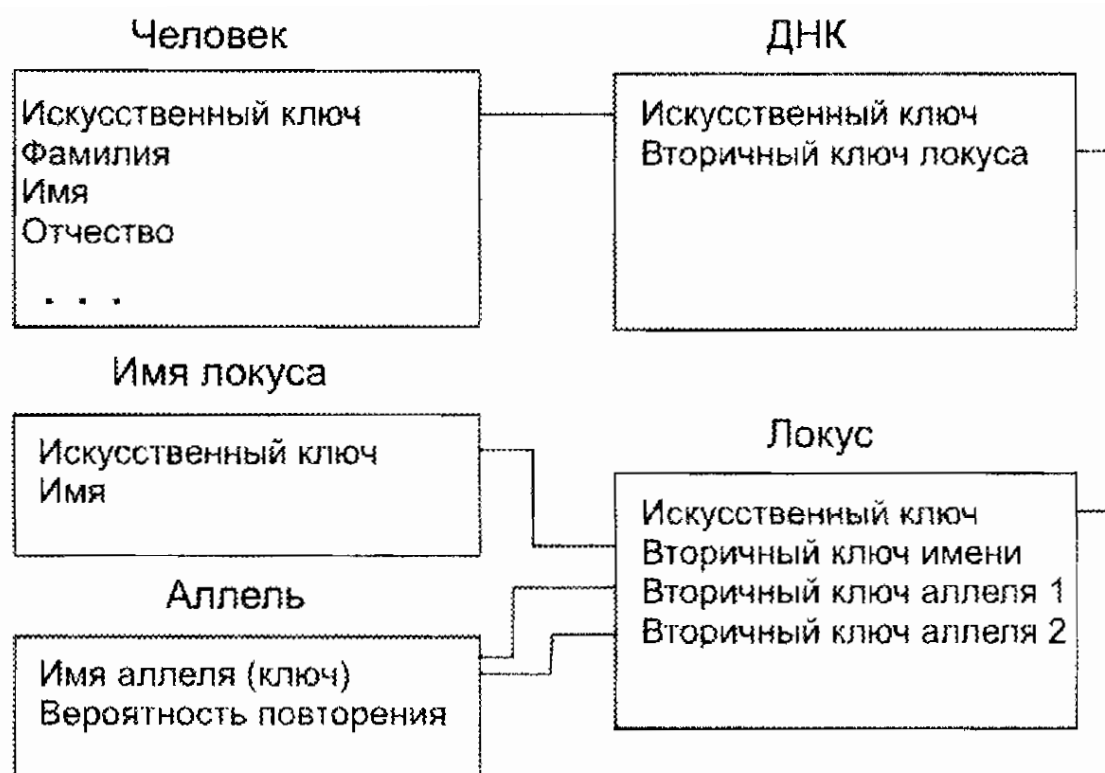


Рис. 7.3. Окончательная структура данных

Заданные связи должны обеспечивать так называемую целостность данных. Это означает, что взаимосвязанные элементы данных не могут существовать независимо друг от друга. Так, например, локус не может существовать в БД без привязки к конкретной ДНК. Также бессмысленна информация о ДНК без указания, к какому человеку она относится. Обеспечение целостности данных означает, что взаимосвязанные элементы не могут существовать друг без друга: если удаляется из БД какой-либо из этих элементов, то должен удаляться и другой, либо должно быть запрещено удаление обоих элементов. Целостность данных обеспечивается заданием специальных свойств связей элементов, чтобы выполнялись указанные условия. Это обеспечение зависит от конкретной системы, на основе которой формируется БД (Access, SQL-сервер, Oracle и т.д.), но в любом случае оно должно быть обеспечено.

В БД должна быть обеспечена достоверность и точность хранимых данных. Это означает, что данные должны правильно характеризовать с количественной стороны те или иные параметры предметной области. Так, в каждом локусе должны быть указаны ровно два аллеля и именно те, которые соответствуют данной ДНК. Это обеспечивается программными и организационными средства-

ми. К программным средствам относится выбор соответствующих типов данных и использование всевозможных условий, накладываемых на данные в тех или иных полях, а также созданием различных справочников. Например, имя локуса может быть выбрано только из вполне определенного набора имен, для задания которого была ранее выделена таблица *Имя локуса*. Организационные меры будут рассмотрены ниже.

БД должна также обладать непротиворечивостью данных. Это означает, что по имеющимся данным нельзя сделать взаимоисключающих выводов. Так, если где-то указано, что для данной ДНК локус *Amelogenin* содержит аллели X и Y (т.е. ДНК принадлежит мужчине), то не должно быть возможности каким-либо другим образом прийти к выводу, что это женщина. Непротиворечивость данных, в первую очередь, обеспечивается тем, что все данные хранятся в единственном экземпляре, и нет возможности иметь в разных местах различные значения одного и того же параметра. Это обеспечивается указанной выше нормализацией данных.

И еще одно замечание. Когда БД достигнет больших величин (миллионы данных), поиск нужной информации в нормализованной БД может выполняться достаточно медленно. В этом случае можно частично денормализовать созданную БД, объединив сущности *ДНК* и *Локус*. В этом случае в каждом экземпляре потребуется перечислить все возможные локусы, а заполнять только те, которые характерны для данного экземпляра. При этом увеличится объем БД, но это может существенно увеличить быстродействие.

На стадии физического проектирования и физической реализации следует разработать средства ввода информации. Как правило, с этой целью используются различные *формы* – специальные окна на экране монитора, содержащие средства ввода с клавиатуры нужной информации. Такие формы можно использовать как для ввода новой информации, так и для корректировки уже имеющейся, а также для просмотра находящихся в БД данных.

Как правило, для создаваемой системы следует предусмотреть специальные *отчеты*, позволяющие получить на бумаге результаты работы системы. Обычно они имеют ту же форму, что и документы, создаваемые ручным путем.

7.5. Физическая реализация

БД реализуется на имеющихся аппаратных и программных средствах. Помимо собственно БД необходимо создать также программы работы с данными. Здесь должны быть предусмотрены средства ввода, корректировки, обработки и удаления данных.

В каждой БД важно обеспечить правильность ввода новых данных и коррекции уже имеющихся. В рассматриваемой БД это особенно важно, поскольку вводится большое количество чисел и символов, практически никак не связанных друг с другом в логическом плане. Ввод таких данных наиболее подвержен неконтролируемым ошибкам. Например, если какому-то аллелю задать в качестве имени не то число, какое следует, то такую ошибку выявить не удастся никакими программными средствами, а нужная информация будет безвозвратно потеряна. Важным способом повышения достоверности введенных данных являются организационные меры. Так, ввод данных следует поручать только наиболее ответственным сотрудникам, используя соответствующую систему доступа к данным. Целесообразно также фиксировать данные о сотруднике, который ввел данные и время последнего обновления. Если позволяют возможности, целесообразно вводить одну и ту же информацию несколько раз и разными сотрудниками. В этом случае вероятность ввода неправильной информации существенно уменьшается.

Другой серьезной проблемой в рассматриваемой системе является организация эффективного поиска нужной информации. Обеспечивается это специальными программными средствами. Поиск нужной ДНК, по-видимому, целесообразно начинать с анализа локуса Amelogenin, так как в этом случае можно сразу же уменьшить вдвое множество исследуемых объектов. Часто для организации поиска информации используется специальный язык SQL (Structured Query Language) – язык структурированных запросов, предназначенный для организации поиска. Этой же цели служит и использование индексов – специальных таблиц, позволяющих наиболее эффективно осуществлять поиск. Наконец, можно провести частичную денормализацию БД, как было сказано выше.

При создании системы необходимо также разработать инструкции пользователей по работе с ней, а также организовать обучение персонала работе с системой.

7.6. Концепции развития национальных систем генетической регистрации граждан

Анализ опыта зарубежных стран в данной области свидетельствует о большом разнообразии концепций развития национальных систем генетической регистрации граждан. В основе таких различий лежат главным образом особенности законодательства и уровень социально-экономического развития страны. Общим, однако, является то, что ни в одной из ведущих стран мира пока не принято решение о генетической регистрации всего населения, поскольку это сопряжено не только с огромными финансовыми затратами, но и с определенными противоречиями национальному законодательству.

Наиболее рациональным путем решения проблемы является формирование базы данных в первую очередь по тем категориям лиц и по тем видам преступлений, по которым использование накопленных данных уже на начальном этапе позволит получить положительный результат.

1 января 2009 года в нашей стране вступил в силу ***Федеральный закон «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации»***, в котором установлены порядок получения, учета, хранения, использования, передачи и уничтожения биологического материала и обработки геномной информации.

Закон направлен на повышение эффективности борьбы с преступностью, в том числе с терроризмом и экстремизмом, на установление по неопознанным трупам личности человека, розыск пропавших без вести граждан РФ, иностранных граждан и лиц без гражданства.

Геномная информация, согласно статье 1 Закона, представляет собой персональные данные, включающие кодированную информацию об определенных фрагментах дезоксирибонуклеиновой ки-

слоты (ДНК) физического лица или неопознанного трупа, не характеризующих их физиологические особенности.

Законом установлено, что в Российской Федерации государственная геномная регистрация проводится в целях идентификации личности человека (статья 2 Закона). Государственной геномной регистрации подлежат граждане РФ, а также иностранные граждане и лица без гражданства, проживающие или временно пребывающие на территории РФ (статья 5 Закона).

В соответствии со статьей 6 Закона в РФ проводится добровольная государственная геномная регистрация и обязательная государственная геномная регистрация.

Добровольная регистрация граждан РФ, а также иностранных граждан и лиц без гражданства, проживающих или временно пребывающих на территории РФ, проводится на основании их письменного заявления и на платной основе учреждениями судебно-медицинской экспертизы, входящими в государственную систему здравоохранения, совместно с подразделениями органов внутренних дел РФ, к компетенции которых относится указанный вид деятельности (статья 8 Закона).

Законом определен порядок добровольной государственной геномной регистрации несовершеннолетних лиц, а также лиц, признанных судом ограниченно дееспособными либо недееспособными. Так, регистрация *несовершеннолетних* лиц может проводиться на основании письменного заявления их родителей (усыновителей) или опекунов, попечителей. Получение биологического материала должно осуществляться в присутствии родителей (усыновителей) или опекунов, попечителей несовершеннолетних лиц (пункт 4 статьи 8 Закона).

Добровольная государственная геномная регистрация граждан РФ, признанных *недееспособными* или ограниченными судом в дееспособности, проводится также на основании письменного заявления их опекунов или попечителей. Получение биологического материала указанных граждан может проводиться только в присутствии опекунов и попечителей.

В соответствии со статьей 7 Закона *обязательной* государственной геномной регистрации подлежат:

1) лица, осужденные и отбывающие наказание в виде лишения свободы за совершение тяжких или особо тяжких преступлений, а также всех категорий преступлений против половой неприкосновенности и половой свободы личности. Регистрация указанных лиц проводится учреждениями, исполняющими уголовные наказания в виде лишения свободы, совместно с подразделениями органов внутренних дел РФ (подпункт 1 пункта 1 статьи 9 Закона);

2) неустановленные лица, биологический материал которых изъят в ходе производства следственных действий. Регистрация указанных лиц проводится органами предварительного следствия, органами дознания совместно с подразделениями органов внутренних дел РФ и учреждениями судебно-медицинской экспертизы, входящими в государственную систему здравоохранения (подпункт 2 пункта 1 статьи 9 Закона).

Кроме того, *обязательной* государственной геномной регистрации подлежат неопознанные трупы. Их регистрация проводится органами предварительного следствия, органами дознания и органами, уполномоченными на осуществление оперативно-розыскных мероприятий по розыску без вести пропавших лиц, а также установление по неопознанным трупам личности человека, совместно с подразделениями органов внутренних дел РФ и учреждениями судебно-медицинской экспертизы, входящими в государственную систему здравоохранения (подпункт 3 пункта 1 статьи 9 Закона).

Согласно статье 10 Закона, *условия получения, учета, хранения, использования, передачи и уничтожения* биологического материала и обработки геномной информации при проведении государственной геномной регистрации должны исключать возможность их утраты, повреждения, искажения, несанкционированных доступа к ним и их передачи.

В статье 12 Закона определены *сроки* хранения геномной информации. Установлено, что геномная информация, полученная при проведении геномной регистрации граждан РФ, а также иностранных граждан и лиц без гражданства, в том числе лиц, отбывающих наказание в виде лишения свободы за совершение тяжких или особо тяжких преступлений, а также всех категорий преступлений против половой неприкосновенности и половой свободы

личности, хранится до установления факта их смерти, а при отсутствии сведений об их смерти – до даты, когда им исполнилось бы 100 лет.

Геномная информация, полученная при проведении государственной геномной регистрации неустановленных лиц, биологический материал которых изъят в ходе производства следственных действий, хранится 70 лет с момента ее получения.

Геномная информация, полученная при проведении государственной геномной регистрации неопознанных трупов, хранится до установления личности человека, но не более 70 лет.

Законом установлено, что геномная информация, полученная в результате проведения государственной геномной регистрации, используется в следующих *целях*:

1) предупреждение, раскрытие и расследование преступлений, а также выявление и установление лиц, их совершивших;

2) розыск пропавших без вести граждан Российской Федерации, а также иностранных граждан и лиц без гражданства, проживающих или временно пребывающих на территории Российской Федерации;

3) установление личности человека, чей труп не опознан иными способами;

4) установление родственных отношений разыскиваемых (устанавливаемых) лиц (статья 14 Закона).

Право на использование геномной информации имеют суды, органы предварительного следствия, органы дознания и органы, осуществляющие оперативно-розыскную деятельность. Использование геномной информации в интересах иностранных государств осуществляется в соответствии с международными договорами РФ (статья 15 Закона).

В статье 16 Закона определено, что геномная информация, полученная в результате проведения государственной геномной регистрации, *уничтожается* федеральным органом исполнительной власти, осуществляющим ее хранение, по истечении сроков хранения, установленных Законом. При этом предусмотрено, что геномная информация, полученная в результате проведения добровольной государственной геномной регистрации, может быть уничто-

жена на основании письменного заявления лиц, прошедших такую регистрацию, а также родителей (усыновителей) или опекунов, попечителей несовершеннолетних лиц или граждан РФ, признанных недееспособными или ограниченными судом в дееспособности.

В соответствии со статьей 17 Закона *надзор за его исполнением* осуществляется Генеральным прокурором РФ и подчиненными ему прокурорами.

Федеральные органы государственной власти и органы государственной власти субъектов РФ в пределах своей компетенции осуществляют контроль за деятельностью государственных органов и учреждений, проводящих государственную геномную регистрацию. Ведомственный контроль осуществляется вышестоящими органами и их должностными лицами. Порядок осуществления ведомственного контроля определяется соответствующими нормативными правовыми актами (статья 18 Закона).

Действия (решения) должностных лиц государственных органов и учреждений, проводящих государственную геномную регистрацию, нарушающие права и свободы человека и гражданина, могут быть оспорены в суде.

Финансирование мероприятий по проведению государственной геномной регистрации осуществляется за счет средств федерального бюджета.

Контрольные вопросы

1. Каково основное назначение базы данных ДНК?
2. Что такое банк ДНК?
3. Перечислите основные этапы создания БД.
4. Перечислите случаи, когда возникает необходимость исследования объектов, хранящихся в банке ДНК.
5. Что вы знаете о зарубежном опыте создания баз данных ДНК?
6. Расскажите о Федеральном законе «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации».
7. Что такое геномная регистрация, для чего она проводится?
8. Какие виды регистрации вы знаете?
9. Расскажите о сроках хранения геномной информации.
10. В каких целях используется геномная информация?

Библиографический список

1. Уголовно-Процессуальный Кодекс Российской Федерации. Официальный текст. Текст Кодекса приводится по состоянию на 1 сентября 2009 г.

2. Федеральный закон от 31 мая 2001 г. № 73-ФЗ «О государственной судебно-экспертной деятельности в Российской Федерации» (с изменениями от 30 декабря 2001 г.).

3. Федеральный закон от 26 ноября 2008 г. «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации».

4. Пименов М.Г., Культин А.Ю., Кондрашов С.А. Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа: Учебное пособие. М.: ГУ ЭКЦ МВД России, 2001.

5. Культин А.Ю., Стороженко И.В., Пименов М.Г., Кондрашов С.А. Криминалистическое исследование STR-локусов ДНК костных останков человека в целях идентификации личности: Методические рекомендации. М.: ЭКЦ МВД России, 2004.

6. Пименов М.Г., Кондрашов С.А., Стороженко И.В., Культин А.Ю., Бакун К.В. Исследование частот встречаемости аллелей STR-локусов среди жителей России: Информационное письмо. М.: ЭКЦ МВД России, 2004.

7. Пименов М.Г., Кондрашов С.А., Платоненкова Л.С., Рыбакова А.А., Барышева М.В. Экспертные методики исследования тканей и выделений человека: Учебное пособие. М.: ЭКЦ МВД России, 2006.

8. Кондрашов С.А., Дукова И.В., Культин А.Ю., Платоненкова Л.С., Иванов П.Л., Плахина Н.В. Терминологический справочник по судебной генетической экспертизе: терминологический справочник. М.: ЭКЦ МВД России, 2009.

9. Лабораторный практикум “Системы баз данных в телемедицинских технологиях”: Уч. пособие / В.В. Уйба, Л.Н. Бежина, В.Г. Никитаев, О.С. Цека, Ю.Д. Голубев, А.М. Епанешников, Е.Ю. Бердникович, М.Г. Левадная, Н.Н. Петровичев, И.П. Шабалова, Е.А. Петухова, А.Н. Проничев, К.С. Чистов, М.А. Чистяков, В.М. Братчиков, Л.Л. Голубева, О.Г. Коваленко, Н.С. Таврина. М.: МИФИ, 2006.

10. Культин А.Ю., Стороженко И.В., Пименов М.Г., Бакун К.В. Криминалистическое исследование митохондриальной ДНК биологических следов человека: Методические рекомендации. М.: ЭКЦ МВД России, 2009.

11. Россинская Е.Р., Галяшина Е.И., Зинин А.М. Теория судебной экспертизы. Учебник. М.: Норма, 2009.

12. Стороженко И.В., Культин А.Ю. Исследование ДНК тканей и выделений человека на автоматизированных системах: Учебное пособие. В печати.

13. Культин А.Ю., Стороженко И.В., Никитаев В.Г., Проничев А.Н., Власов В.А. Экспертная оценка и вероятностно-статистическая обработка результатов исследования ДНК при установлении биологического родства: Учебное пособие. В печати.

Ирина Владиленовна Стороженко,
Алексей Юрьевич Культин,
Валентин Григорьевич Никитаев,
Александр Николаевич Проничев,
Елена Юрьевна Бердникович

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
В СУДЕБНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ЭКСПЕРТИЗЕ

Учебное пособие

Редактор *Е. Н. Кочубей*

Макет подготовлен *Е. Н. Кочубей*

Подписано в печать 15.04.2010. Формат 60×84 1/16.
Изд. № 033-1. П.л. 7,0. Тираж 100 экз. Заказ № 139.
Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ».
Типография НИЯУ МИФИ. 115409, Москва, Каширское шоссе, 31